

Aus dem Institut für Virologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. R. Rott

**Hemmung der Vermehrung
des Virus der Vesikulären Stomatitis
durch 2-Desoxy-D-Glukose**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Gerolf H. K. W. Hau
Tierarzt aus Oberissigheim

Gießen 1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545932_0065

Aus dem Institut für Virologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. R. Rott

**Hemmung der Vermehrung
des Virus der Vesikulären Stomatitis
durch 2-Desoxy-D-Glukose**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Gerolf H. K. W. Hau
Tierarzt aus Oberissigheim

Gießen 1973

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
in Gießen

Dekan: Professor Dr. M. Frummer

Berichterstatter: Professor Dr. R. Rott

Tag der mündlichen Prüfung: 6.12.73



Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung und Problemstellung	1
II. Material und Methoden	5
1. Virus und Virusvermehrung	5
2. Zellkultur	6
3. Plaque-Test in embryonalen Hühnerzellen	7
4. Hämagglutinationsreaktion	7
5. Herstellung der radioaktiv markierten Proben für die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	8
6. Die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	9
7. Bestimmung der RNS-Polymerase-Aktivität	12
8. Reaktionsgemisch für den Polymerase-Test	13
9. Einbau von radioaktiv markierten Vorläufern der RNS- und Proteinsynthese in VSV-infizierten Zellen	13
10. Hybridisierung von in vivo und in vitro synthetisierter VSV-RNS	14
11. Verwendete Lösungen	16
III. Eigene Untersuchungsergebnisse	20
1. Hemmung von VSV und NDV durch 2-Desoxyglukose im pyruvathaltigen Medium	20
2. Hemmung der VSV-Vermehrung durch 2-DOG nach Doppelinfektion	25
3. Hemmung der VSV-Vermehrung durch 2-Desoxyglukose zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion	27
4. Aufhebung der 2-Desoxyglukose-Wirkung durch Mannose und Glukose	29
5. Einfluß von 2-Desoxyglukose auf die Proteinsynthese VSV-infizierter embryonaler Hühnerzellen	35
6. Synthese der VSV-RNS in Gegenwart von 2-Desoxyglukose	35
7. Verhalten der VSV-spezifischen RNS-Polymerase in Gegenwart von 2-DOG	37

8. Hybridisierung der in vitro und in vivo synthetisierten VSV-RNS	40
9. Einfluß von 2-Desoxyglukose auf den Einbau von radioaktiven Aminosäuren in VSV-Proteine	42
IV. Besprechung der Ergebnisse	47
V. Zusammenfassung	51
VI. Literaturverzeichnis	52
Lebenslauf	

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Vermehrung einiger Glykoproteid-haltiger Viren, wie Influenza- und Arboviren, läßt sich spezifisch durch Glukosamin bzw. 2-Desoxy-D-Glukose hemmen, während andere ähnlich aufgebaute Viren, wie das Newcastle disease Virus (NDV) und das Virus der vesikulären Stomatitis (VSV) nicht inhibiert werden (Kaluza, Scholtissek u. Rott, 1972).

Eine Analyse dieser Hemmung ergab, daß dabei nur die Produktion von funktionstüchtigen Glykoproteiden beeinflusst wird (Klenk, Scholtissek u. Rott, 1972); (Kaluza, Schmidt u. Scholtissek, 1973).

Aufgabe dieser Arbeit sollte es sein, Ansatzpunkte zur Lösung der Frage zu finden, warum das VSV in seiner Synthese durch 2-Desoxy-D-Glukose nicht beeinflusst wird. Entsprechende Untersuchungen können grundsätzliche Unterschiede in der Replikation der verschiedenen Glykoproteid-haltigen Viren offenlegen.

Das Virus der vesikulären Stomatitis

Das Virus der vesikulären Stomatitis (VSV) verursacht eine äußerst ansteckende, bläschenbildende Erkrankung bei Pferd, Rind und Schwein. Die Erkrankung ist durch ein, der MKS-ähnliches vesikuläres Exanthem in und in der Umgebung der Maulhöhle gekennzeichnet. Erstmals beschrieben wurde die Erkrankung um 1880 von Theiler, in Südafrika. Einzelne Erkrankungsfälle beim Menschen sind beschrieben.

Das Virus ist aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften ein repräsentativer Vertreter der Rhabdoviren (Wildy, 1971).

Das infektiöse Viruspartikel, oder auch B-Partikel (bullet-shaped), dessen Größe ca. $1750 \text{ \AA} \times 680 \text{ \AA}$ beträgt, hat die Form einer Gewehrkugel. Das Molekulargewicht der RNS beträgt $3,4 - 3,8 \times 10^6$ daltons. Das Virion besteht aus einem helical gewundenen Ribonucleoprotein, wobei auf der Einzelstrang-RNS, dem Virusgenom, Polypeptiduntereinheiten sitzen, deren Größe ca. $90 \text{ \AA} \times 30 \text{ \AA} \times 30 \text{ \AA}$ beträgt. Das Ribonucleoprotein bildet das Nucleokapsid oder Core, welches in eine dreischichtige Hülle, dem Envelope, eingeschlossen ist. Vom Envelope erheben sich stachelartige Fortsätze (Spikes), deren Länge ca. $100 \text{ \AA}$ beträgt (Simpson u. Hauser, 1966; Howatson u. Whitmore, 1962).

Eine funktionelle RNS abhängige RNS-Polymerase ist Bestandteil des Virions. Sie ist mit dem Nucleokapsid assoziiert (Baltimore, 1970; Bishop, 1971).

Isolierte VSV-RNS ist nicht infektiös. Erst die virus-eigene Polymerase induziert die VSV-Produktion, indem sie an der VSV-RNS als Template einen komplementären RNS-Strang bildet, welcher dann als messenger dienen kann. Das heißt, die VSV-Polymerase wirkt vorwiegend als Transkriptase (Baltimore, 1970).

Aufgrund von Untersuchungen in der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese enthält das VSV vier Hauptstrukturproteine. Sie werden als L = Large, G = Glykoprotein, N = Nucleoprotein und M = niedermolekulares Membranprotein bezeichnet (David, 1973 ; Wagner, 1973). Das L-Protein hat ein Molekulargewicht (MG) von 275.000 und stellt entweder ein distinktes Virusprotein dar, oder ist ein Aggregat kleinerer Einheiten (Wagner, 1969). Das G-Protein ist ein Glykoprotein mit einem

MG von 81.000 und ist Bestandteil des Envelopes. Das N-Protein ist Bestandteil des Nucleoproteins und hat ein MG von 60.000. Das M-Protein ist ein Oberflächenprotein. Es hat ein MG von 34.500 und gehört zum Envelope. Es hat typspezifische Eigenschaften. Die beiden verschiedenen Serotypen VSV-Indiana und VSV-New Jersey unterscheiden sich im MG des M-Proteins. Daneben treten in virusinfizierten Zellen zwei virusinduzierte, aber nicht im Virion enthaltene Proteine auf, die als NS 1 (MG: 50.000) und NS 2 (MG: 30.000) bezeichnet werden (Wagner, 1970). Die Bildung der Virusstrukturproteine scheint unabhängig voneinander zu erfolgen. Bisher sind keine Vorläufer gefunden worden.

Das Nucleoprotein wird in einem intraplasmatischen Pool gesammelt, aus welchem es bei Bedarf für die Virus-maturation gezogen wird. Dieser Schritt muß energieabhängig sein, da er durch Kälte zu unterbrechen ist (David, 1973). G- und M-Proteine sind nur an zytoplasmatische Membranen gebunden erfaßbar.

Die Kohlenhydratzusammensetzung des VSV ist die folgende: Neben vier Hexosen, nämlich Glukose, Galaktose, Mannose und Fukose, zwei Hexosaminen, nämlich Glukosamin und Galaktosamin, findet man N-Acetylneuramin(= Sialin)-säure. Die prozentuale Bestimmung der chemischen Bestandteile ergibt: 3% RNS, 65% Protein, 20% Lipide, vorwiegend Cholesterolderivate, und ca. 13% Kohlenhydrate, exklusiv der Pentosen der RNS (McSharry, 1971).

Die im Viruspartikel vorkommenden Lipide entsprechen in ihrer Zusammensetzung weitgehend derjenigen der Plasmamembran der Wirtszelle (McSharry, 1971). Aufgrund dieser Befunde und elektronenoptischen Untersuchungen läßt

sich das Envelope des VSV als eine virusspezifisch veränderte Plasmamembran definieren (Cartwright, 1968).

Neben den infektiösen Viruspartikeln werden in infizierten Zellen autointerferierende, sogenannte T-Partikel (truncated-particles) gebildet. Sie treten besonders dann auf, wenn das Virusmaterial mit einer hohen Infektionsmultiplizität passagiert wird. Sie sind nicht infektiös, hemmen aber die Bildung von B-Partikeln in der Wirtszelle. Die T-Partikel sind von sphärischer Gestalt und besitzen einen Durchmesser, der mit 680 Å demjenigen der B-Partikel entspricht.

Das Molekulargewicht der RNS beträgt $1,1 \times 10^6$ daltons, die Länge des Nucleokapsids etwa ein Drittel desjenigen der B-Partikel. Im übrigen enthalten die T-Partikel alle in den B-Partikeln vorkommenden Komponenten.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Virus und Virusvermehrung

Zu den im folgenden beschriebenen Untersuchungen benutzte ich den VSV-Serotyp "Indiana", den NDV-Stamm "Italien" und das Virus der Klassischen Geflügelpest (KP-Virus), Stamm "Rostock", die alle im Institut gehalten werden.

Die Viren (KP-Virus und NDV) wurden im embryonierten Hühnerei und in der Zellkultur, das VSV nur in der Zellkultur gezüchtet.

Zur Züchtung im embryonierten Hühnerei wurden 0,2 ml Virussuspension, die etwa 10^3 plaquebildende Einheiten (PBE) enthielten, in den Allantoissack 11 Tage alter Hühnerembryonen injiziert und die Eier anschließend bei 37°C weiterbebrütet. Nach dem Absterben der Embryonen wurden die Eier für mindestens 4 Stunden bei 4°C gehalten und dann die infektiöse Eiflüssigkeit in der üblichen Weise gewonnen.

Für die Vermehrung in der Zellkultur wurden embryonale Hühnerzellen verwendet, die in Petrischalen mit einem Durchmesser von 9 cm für 24 Stunden angezüchtet waren. Nach zweimaligem Waschen der Zellrasen mit Phosphatpufferlösung (PBS), pH 7,2, wurde mit 3 ml Virussuspension infiziert. Die Infektionsmultiplizität betrug etwa 10 PBE. Nach 20 Minuten langer Adsorption bei 37°C wurden die Zellrasen erneut zweimal mit PBS gewaschen, mit 9 ml Hepes-Medium überschichtet und schließlich für 8 Stunden bei 37°C gehalten. Geerntet wurde virushaltiges Medium und Zellen.

Die Zellen wurden nach Zusatz von 3 ml PBS durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen aufgebrochen. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch 10 Min. langes Zentrifugieren bei 3000 Umdrehungen pro Minute (UpM) abzentrifugiert. Der Überstand enthielt das neu-synthetisierte zellgebundene Virus.

2. Zellkultur

Primäre Zellkulturen aus embryonalen Hühnerzellen wurden entsprechend den Angaben von Zimmermann und Schäfer (1960) wie folgt hergestellt:

Nach Markierung der Luftblasen und Desinfektion wurden die Eischalen am stumpfen Ende abgehoben und die 11 Tage alten Embryonen in sterilen Petrischalen gesammelt. Danach wurden die Embryonen dekapitiert, im Trypsinierungskolben zweimal mit GKN- oder PBS-Puffer gewaschen und anschließend 15 Min. lang auf einem Magnetrührer bei 37° C trypsiniert. Die dazu verwendete Lösung bestand aus einer Mischung von GKN-Puffer und 10%igem Trypsin (Endkonzentration des Trypsins 0,2%). Danach wurde der Überstand abgegossen und steril im Eisbad aufgehoben. Dieser Vorgang kann bis zu fünfmal wiederholt werden. Die gesammelte Zellsuspension wurde durch sterile Nylon-Gaze filtriert und anschließend 5 Min. lang bei 1500 UpM zentrifugiert. Das Sediment wurde mit Lavit-Medium suspendiert, erneut filtriert und in einer Zählkammer nach Neubauer (Erythrozyten-zählkammer) die Zellzahl/ml festgestellt. Danach wurde die Zellkonzentration mit Lavit, das 10% Kälberserum enthielt, auf ca. 3×10^6 Zellen/ml eingestellt und jeweils 4 ml der Zellsuspension in sterile Plastik-Petrischalen von 5 cm Durchmesser bzw. 12 ml in solche mit einem Durchmesser von 9 cm ausgesät.

Nach 24 Stunden im CO₂-begasten Brutschrank bei 37° C hatte sich am Schalenboden ein geschlossener Zellrasen gebildet.

3. Plaque-Test in embryonalen Hühnerzellen

Die Plaqueteste, die zur quantitativen Bestimmung infektiöser Viruspartikel verwendet wurden, führten wir in 24 Stunden alten, primären Kulturen von embryonalen Hühnerzellen durch, die in Petrischalen mit einem Durchmesser von 5 cm angezüchtet waren. Die Zellrasen wurden mit 0,2 ml einer nach Zehnerpotenzen verdünnten Virussuspension infiziert. Für jede Verdünnungsstufe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Nach der Infektion wurden die Platten 30 Minuten zur Adsorption in den Brutschrank bei 37° C verbracht. Nach der Adsorptionszeit wurden die Zellen mit 4 ml Agar-Überschichtungsmedium überschichtet. Nach Festwerden des Agars kamen die Platten für 40 Stunden in einem CO₂-begasten Brutschrank bei 37° C zur Bebrütung. Zum Anfärben der Zellen wurden die Platten mit 0,05%igem, 1 : 2 mit Aqua bid. verdünntem Neutralrot überschichtet und nach ca. eineinhalb Stunden die Plaques ausgezählt. Das Auszählen erfolgte mit einem Koloniezählgerät der Firma WTW Modell BZG 24.

4. Hämagglutinationsreaktion

Für die Untersuchung bei NDV wurde die Fähigkeit des Virus ausgenutzt, Erythrozyten zu agglutinieren. Diese Reaktion besitzt quantitative Aussagekraft über die Konzentration an hämagglutinierenden Partikeln. Die Hämagglutinations(HA)-Reaktion wurde nach der von Davenport, Rott u. Schäfer (1960) angegebenen Methode durchgeführt.

Aus Hühnerblut gewonnene Erythrozyten wurden dreimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und anschließend in dieser Lösung auf eine 1%ige Konzentration eingestellt.

Auf einer Plastiktüpfelplatte wurde die zu untersuchende Viruslösung nach Zweierpotenzen in 0,4 ml physiologischer Kochsalzlösung ausverdünnt. Hierzu wurden dann je 0,4 ml der Erythrozytensuspension hinzugegeben. Die Platten wurden 45 Minuten bei 4° C gehalten und die Reaktion sodann abgelesen.

Diejenige Virusverdünnung, bei der noch eine deutliche Agglutination erkennbar war, wurde als HA-Titer der Viruslösung angegeben.

5. Herstellung der radioaktiv markierten Proben für die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Das radioaktiv markierte Virusmaterial zur Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese wurde auf folgende Weise hergestellt:

24 Stunden alte embryonale Hühnerzellkulturen in Plastik-Petrischalen mit einem Durchmesser von 5 cm wurden zweimal mit warmer PBS gewaschen und in der üblichen Weise infiziert. Nach 30 Min. Adsorptionszeit wurden die Zellrasen erneut zweimal mit warmer PBS gewaschen und bis zur 4. Stunde p.i. mit 3 ml Hepes-Medium überschichtet. Danach wurde das jeweilige Medium durch radioaktiv markiertes Medium ersetzt. Dem Medium war eine Mischung folgender Isotope zugesetzt worden:

L-(4,5- ³ H)Leucin	(spez. Aktivität	1,0 Ci/mmol)
L-(2,3- ³ H)Valin	(" "	1,5 Ci/mmol)
L-(3,5- ³ H)Tyrosin	(" "	1,0 Ci/mmol)

Die jeweils aufgegebene Menge der Aminosäuremischung betrug 10 $\mu\text{Ci/ml}$.

Die Isotope stammten von "The Radiochemical Centre, Amersham, Buckinghamshire, England".

Das radioaktive Medium blieb während der in den Versuchen angegebenen Zeiten auf den Zellen. Danach wurde der Einbau mittels zweimaligem Waschen des Zellrasens mit eiskaltem PBS gestoppt. Der Überstand wurde abgesaugt und 1 ml eiskalter PBS auf die Zellen gegeben. Dann wurden die Zellen mit einem Gummischaber vom Schalenboden abgekratzt und in ein Spitzröhrchen überführt. Danach wurden die Platten nochmals mit 1 ml PBS gewaschen und die Flüssigkeit ebenfalls in das Spitzröhrchen verbracht. Nach 10 Min. langer Zentrifugation bei 3000 UpM wurde der Überstand dekantiert und das Sediment mit 1 ml PBS resuspendiert. Die suspendierten Zellen wurden mittels Ultraschall aufgebrochen und das Material, wie in "Die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese" beschrieben, weiterverarbeitet.

6. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Für die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese benutzten wir die von Caliguiri und Klenk (1969) beschriebene Methode. Zur Herstellung des Gels wurden folgende Substanzen benötigt:

1. Phosphat-Puffer, 0,1 M, pH 7,2

bestehend aus:

15,4 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

77,3 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

Die Substanzen wurden eingewogen und mit 4000 ml Aqua bid. gelöst. Mit HCl oder NaOH wurde der pH-Wert von 7,2 eingestellt.

2. SDS-Puffer (Sodium dodecyl sulfat = Dodecylsulfat.
Na-Salz $C_{12}H_{25}OSO_3 \cdot Na$; MG: 288,4, Serva, Heidelberg)

1 g SDS wurde in 1000 ml Phosphat-Puffer gelöst.

3. Lösung A

bestehend aus:

20,0 Acrylamid (C_3H_5NO ; MG: 71,1)

0,54 N,N'-Methylenbisacrylamid ($C_7H_{10}N_2O_2$;
MG: 154,2)

ad 100,0 SDS-Puffer

4. Lösung B

sie wurde jeweils frisch angesetzt und bestand aus:

0,15 Ammoniumpersulfat ($(NH_4)_2S_2O_8$) MG: 228,2

0,1 ml Tetramethyläthylendiamin = TMED
($C_6H_{16}N_2$; MG: 116,2)

100,0 SDS-Puffer

Um ein zehnprozentiges Gel zu erhalten, wurden Lösung A und B zu gleichen Teilen gemischt. Die Mischung wurde mittels einer Pasteur-Pipette in das Gelröhrchen pipettiert. Oben auf das Gel wurden einige Tropfen der Lösung B gegeben. Nach einer Polymerisationszeit von ca. 30 Min. wurde die Lösung B wieder vom Gel genommen und durch Spacer-Gel ersetzt. Das Spacer-Gel hatte folgende Zusammensetzung:

3 Vol. SDS + 1 Vol. Lsg. A + 8 Vol. Lsg. B
(2,5%iges Gel)

Das Spacer-Gel benötigte zur Polymerisation eine Stunde. Danach kam das Gelröhrchen in den Vorlauf.

Die von mir benutzten Röhrchen hatten einen Innendurchmesser von 4 mm und eine Länge von 10 cm. Die Anlage zur Halterung der Gele stammte von Shandon Ltd., London.

Beschickt wurden die Gele mit 100 γ des zu untersuchenden Materials, welches mit 10 γ Mercaptoäthanol (1 : 10 verdünnt mit Aqua bid.) und 10 γ 10%igem SDS versetzt war. Diese Mischung wurde eine Minute im kochenden Wasserbad gehalten. Nach dem Abkühlen der Probe wurde ein Tropfen Glycerin und ein Tropfen Bromphenolblau (4 mg/10 ml) hinzugegeben und das Ganze auf einem mechanischen Rüttler durchmischt.

Nach einer Laufzeit von 17 Stunden bei 30 Volt wurden die Gele aus den Röhrchen gedrückt und bei -20° C bis zur Auswertung gelagert.

Zum Schneiden der Gele wurden diese kurz vorher im Methanoleisbad gekühlt und dann mit einem Gelschneider in gleiche Scheibchen geschnitten. Die Scheibchen hatten eine Dicke von ungefähr 1 mm. Die Scheibchen wurden in Plastikröhrchen verbracht und mit 0,5 ml Soluene (Packard) überschichtet. Nach Verschuß der Röhrchen wurden sie etwa 2 Stunden lang bei 60° C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde 2,5 ml Toluol plus 1% Äthylenglycolmonoäthyläther hinzugefügt.

Nach ausreichendem Vorkühlen der Proben wurden diese sodann in einem Packard-Liquid-Scintillation-Zählgerät gezählt.

7. Bestimmung der RNS-Polymerase-Aktivität

Zur Bestimmung der Enzym-Aktivität wurde folgende Technik angewendet:

Die infizierten Zellen wurden 5 Stunden nach der Infektion (p.i.) mit Minimalpuffer gewaschen und dann im Dounce-Homogenisator aufgebrochen. Aus dem Zellhomogenat wurden durch Zentrifugation die Zellkerne entfernt. Der Überstand wurde in 0,5 ml-Mengen aufgeteilt, wovon jede im Eisbad mit der gleichen Menge ^3H -GTP-Mischung versetzt wurde. Die Enzymreaktion wurde bei 32°C getestet. Zu den angegebenen Zeiten wurde die Reaktion durch Ausfällen der Proteine mit 12%iger Trichloressigsäure (TCE), die 0,1 M $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ enthält, gestoppt und folgendermaßen gewaschen:

2 x mit 6%iger TCE in 0,1 M Pyrophosphatlösung

1 x mit 6%iger TCE, ohne Pyrophosphat

1 x mit einem Gemisch von Alkohol und Äther (1 : 1)

Nachdem der Rest des Alkohol-Äther-Gemisches bei Zimmertemperatur verdampft war, wurden die Sedimente mit 0,2 n NaOH bei Siedehitze ca. 20 Min. hydrolysiert, die Lösung in Zählgläschen überpipettiert und ihre Radioaktivität im Packard-Liquid-Scintillationszähler bestimmt. Als Nullwert wurde dem jeweiligen Resultat einer Probe dasjenige Zählergebnis einer Probe abgezogen, die anstatt bei 32°C 15 Min. im Eisbad inkubiert wurde. Von allen Proben wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) die Proteinkonzentration bestimmt und die in die RNS eingebaute Radioaktivität auf 1 mg Protein bezogen.

8. Reaktionsgemisch für den Polymerase-Test

(Endkonzentration, nach Mischung mit Cytoplasma-
fraktion 1 : 1)

Kreatin-Phosphat	2,75 mM
Kreatin-Phosphokinase (ATP-Kreatin-Phosphotransferase)	$5,5 \times 10^{-6}$ g/ml
ATP, CTP, UTP, unmarkiert, je	1 mM
MgCl ₂	4 mM
KCl	50 mM
2-Mercaptoäthanol	5 mM
Tris-HCl-Puffer, pH 8,0	33 mM
RNS (aus Rattenleber)	30×10^{-6} g/ml
³ H-GTP	2,5 µCi/ml

9. Einbau von radioaktiv markierten Vorläufern der RNS- und Proteinsynthese in VSV-infizierten Zellen

Zur Bestimmung der RNS- bzw. der Proteinsynthese in infizierten Zellen wurde der Einbau von ³H-Uridin bzw. ³H-Leucin bestimmt. Um den Einbau zu messen, wurde folgende Technik angewendet:

In das Medium (3 ml) der Zellkulturen wurden 25 µCi des entsprechenden Isotops mit einer spezifischen Aktivität von 50 µCi/ml gegeben. Nach der in den Versuchen angegebenen Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen zweimal mit kaltem PBS gewaschen, um den Weitereinbau des Isotops zu stoppen. Danach wurde zu jeder Kultur 2 x je 5 ml 6%ige TCE gegeben. Der vereinigte säurelösliche Extrakt wurde bis zur Messung im Kühlschrank aufgehoben. Der Extrakt enthielt die markierten phosphorylierten RNS-Vorläufer. Die Extraktion wurde zweimal wiederholt, um sicher zu sein, daß nahezu alle

Vorläufer aus den Zellen herausgelöst worden waren. Dann wurde der Zellrasen zweimal mit 96%igem Alkohol behandelt, um die verbliebene TCE zu entfernen und gleichzeitig dem Zellrasen Flüssigkeit zu entziehen. Am Ende wurden die Zellen mit Methanol getrocknet. Zu jeder Petrischale wurden anschließend 1 ml 0,2 n NaOH zum Zwecke der Hydrolysierung gegeben. Schließlich wurden die Zellen 10 Min. lang in einem unbegasteten Brutschrank bei 63° C belassen.

Die aufgelösten Zellen wurden in Szintillationszählgläsern der Firma Packard überpipettiert, die Petrischalen dann mit 1 ml H₂O nachgespült und die Waschflüssigkeit ebenfalls in die Zählgläser gegeben. Schließlich wurde mit 10 ml Bray-Szintillationsflüssigkeit aufgefüllt.

Die Radioaktivität wurde im TriCarb-Szintillationszähler gemessen. Bei jedem Versuchsansatz wurden zur Kontrolle nichtinfizierte Parallelkulturen auf die gleiche Weise behandelt.

10. Hybridisierung von in vivo und in vitro synthetisierter VSV-RNS

24 Stunden alte embryonale Hühnerzellkulturen auf Plastik-Petrischalen von 9 cm Durchmesser wurden infiziert. (4 Platten/Wert). Zur Markierung der in vitro synthetisierten RNS wurde 5 Std. p.i. das Medium abgesaugt, die Zellrasen 2 x mit Minimalpuffer, einem hypotonen Medium, gewaschen. In dem hypotonen Medium quellen die Zellen. Anschließend wurden die Zellrasen mit Gummischabern vom Schalenboden abgekratzt, und die Suspension im Dounce-Homogenisator homogenisiert. Das Homo-

genat wurde 5 Min. lang bei 4000 UpM zentrifugiert. Der so gewonnene zellkernfreie Überstand wurde verwendet. Er wurde im Verhältnis 1 : 1 mit ^3H -GTP, nichtmarkiertem ATP, UTP und CTP, MgCl_2 , KCl sowie Tris-Puffer, pH 8,1, wie angegeben, gemischt. Diese Mischung wurde 15 Min. lang bei 32°C inkubiert. Zur Markierung der in vivo synthetisierten RNS wurde 5 Std. p.i. ein 30 Min. Puls mit $10\text{ }\mu\text{Ci } ^3\text{H-Uridin/Platte}$ gesetzt. Nachdem die Platten, wie oben beschrieben, aufgearbeitet waren, wurde aus dem zellkernfreien Überstand die RNS mit 80%igem Phenol und 10%igem SDS (5 ml Phenol plus 0,1 ml SDS) extrahiert. Nach dem Ausfällen der radioaktiven RNS durch tropfenweise Zugabe von K-Acetat (5 M, pH 5) wurde sie zweimal mit Äthanol und einmal mit Äther gewaschen und sodann an der Luft getrocknet. Die RNS wurde dann in 2 ml 5 mM Tris-HCl, pH 8,1, und 1 mM EDTA aufgenommen. Die optische Dichte (O.D.) wurde anschließend in einem Zeiss-Spektrometer gemessen.

Für die Hybridisierung wurden $0,1\text{ ml } ^3\text{H-RNS}$ 5 Min. lang auf 100°C erhitzt, abgeschreckt und mit $5\text{ }\mu\text{g}$ bzw. $12\text{ }\mu\text{g}$ Virion-RNS gemischt, die auf folgende Weise gewonnen worden war. VSV wurde in Roller-Flaschen angezüchtet, das virushaltige Medium 10 Std. p.i. abgenommen und 3 Std. lang bei 27.000 UpM zentrifugiert. Das Sediment wurde dann in 10 ml Minimalpuffer aufgenommen und $0,2\text{ ml SDS}$ sowie $0,1\text{ ml } 1\text{ M Tris-HCl}$, pH 8, hinzugefügt. Anschließend wurde die Suspension im Dounce-Homogenisator homogenisiert und die RNS mit Phenol und SDS, wie oben beschrieben, extrahiert. Die ausgefällte RNS wurde in $2\text{ ml } 0,0125\text{ M Tris-Puffer}$ mit $0,005\text{ M EDTA}$ aufgenommen und die O.D. gemessen.

Neben den oben beschriebenen Proben ($5\text{ }\mu\text{g}$ und $12\text{ }\mu\text{g}$) wurde außerdem eine Probe geprüft, die nur $^3\text{H-Uridin}$ -

markierte RNS enthielt, und eine Probe, die nicht erhitzt worden war. Diesen Proben wurde soviel 10fach SSC (1,5 M NaCl, 0,15 M Na-Zitrat) zugegeben, daß die Endkonzentration 2fach SSC betrug. Die gefüllten Röhrchen wurden kurz zentrifugiert und zugeschmolzen. Nach kurzem Verbleiben im Wasserbad bei 80° C wurden sie anschließend über ca. 12 Std. bei 65° C belassen. Nach dieser Zeit wurden die Röhrchen geöffnet. Die Flüssigkeit wurde mittels Pasteur-Pipetten in Zentrifugengläser überführt. Mit 10 λ /Probe einer 1%igen RNase-Lösung wurde dann über 20 Min. bei 17° C die RNase-Verdauung durchgeführt. Nach Zufügung von Trägerprotein und Fällung mit TCE wurden die Präzipitate mittels 0,2 n NaOH hydrolysiert und nach Verbleiben im kochenden Wasserbad für 15 Min. in Zählgläschen überführt. Nach Zugabe von 10 ml Bray-Szintillator wurden die Proben im Packard-Szintillationszähler ausgezählt.

11. Verwendete Lösungen

Minimal Essential Medium (Earle, 1934)

Ansatz pro 10³ ml.

NaCl	72,0 g
KCl	4,0 g
NaH ₂ PO ₄	1,1 g
Glukose	20,0 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	2,0 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	2,0 g
Hepes-Puffer	238,0 g (anstelle NaHCO ₃)
Glutamin	2,9 g
Streptomycin	0,5 g
Penicillin	1 x 10 ⁶ I.E.
Phenolrot	0,16 g

Die Anwendung von HEPES-Puffer (N-2-hydroxyäthyl-piperazin-N-äthansulfonsäure; $C_8H_{18}O_4N_2S$, MG: 238,3) wurde erstmals von Good (1966) beschrieben.

Pyruvathaltiges Earle's Minimal Essential Medium

Beim oben beschriebenen Earle's Minimal Essential Medium wird anstelle von Glukose 11,65 g Na-Pyruvat eingewogen.

Phosphatpufferlösung (n. Dulbecco u. Vogt (1954)) Stammlösung 10fach

NaCl	360,0 g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	154,0 g
KH_2PO_4	17,7 g

Die Substanzen werden getrennt in 5000 ml Aqua bid. gelöst und anschließend 1 : 10 in Aqua bid. verdünnt, steril filtriert und bei 4°C gelagert. Die Pufferlösung hat einen pH-Wert von 7,2.

Neutralrot (zum Anfärben der Zellen beim Plaque-Test)

0,05%ig angesetzt in Aqua bid.

Nach dem Lösen filtrieren. Zum Gebrauch mit Aqua bid. 1 : 2 verdünnen.

2-Desoxy-D-Glukose

der Firma Sigma, St. Louis, Mo., USA

Wir stellten uns eine 1 M Stammlösung mit Aqua bid. her, die zum Gebrauch auf 0,05 mM mit glukosefreiem Earle's Minimal Essential Medium verdünnt wurde. Die Stammlösung wurde bei -20°C gelagert und zum Gebrauch jeweils aufgetaut.

GKN-Puffer (Glukose-Kalium-Natriumchlorid-Puffer)

Ansatz für 10^4 ml; pH 7,2

NaCl	80,0	g
KCl	4,0	g
KH_2PO_4	0,6	g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,602	g
Glukose	10,0	g
Phenolrot	0,04	g
NaHCO_3	4,20	g

Minimal-Puffer (minimal buffer, MB)

Ansatz pro 5000 ml

Tris-HCl, pH 7,4	6,05	g
KCl	3,70	g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	1,525	g
2-Mercaptoäthanol	0,35	ml

Der Ansatz wird mit Essigsäure auf pH 7,2 eingestellt.

Agar (Überschichtungsmedium für den Plaque-Test)

Wir verwendeten den Bactoagar der Firma Difco.

Der Agar wurde 1,4%ig mit Aqua bid. angesetzt, so-
dann bei 120°C autoklaviert und bei 4°C gelagert.

Agar-Überschichtungsmedium

1 Vol.	10fach Lavit
1 Vol.	Lactalbumin
1 Vol.	2,2% NaHCO_3
2 Vol.	Aqua bid.
5 Vol.	1,4%iger Agar

Serva-Pulvermedium, PM 13

(Lactalbumin-Vitamin-Medium = Lavit, Nährmedium für
embryonale Hühnerzellen).

Dieses Medium bezogen wir von Serva, Heidelberg.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

1. Hemmung von VSV und NDV durch 2-Desoxyglukose im pyruvathaltigen Medium

Wie bereits erwähnt, wird die Synthese des Semliki Forest-Virus (SFV) durch die Zugabe von 2-Desoxyglukose (2-DOG) gehemmt (Kaluza, Scholtissek u. Rott, 1973). Diese Hemmung läßt sich durch Mannose oder Glukose aufheben. Im glukosefreien Gewebekulturmedium benötigt man entsprechend etwa 40mal weniger 2-DOG, um die Vermehrung des SFV zu inhibieren (Kaluza, Schmidt u. Scholtissek, 1973). Den gleichen Effekt findet man bei Influenzaviren, deren Bildung ebenfalls durch 2-DOG gehemmt wird (Scholtissek u. Rott, persönl. Mitteilung).

Es sollte daher geprüft werden, ob in Zellkulturen, in deren Nährmedium Glukose durch Pyruvat ersetzt wurde, eine Hemmung der Vermehrung derjenigen Viren möglich ist, die sich normalerweise durch 2-DOG nicht beeinflussen lassen.

In einem Vorversuch konnte gezeigt werden, daß sowohl im pyruvathaltigen, wie auch im glukosehaltigen Medium etwa die gleiche Menge an infektiösem VSV gebildet wird. Wie aus der Abb. 1 hervorgeht, lassen sich auch dann keine signifikanten Unterschiede feststellen, wenn die neugebildeten Viren über mehrere Passagen in den entsprechenden Medien gezüchtet wurden.

Wird für die Hemmversuche VSV verwendet, das in Zellen gezüchtet wurde, die in glukosehaltigem Medium gehalten waren, wird die Virusvermehrung durch 2-DOG auch dann nicht gehemmt, wenn die Zellen nach der 30 Min. langen Adsorptionszeit mit pyruvathaltigem Medium überschichtet wurden. Eine Hemmung durch 2-DOG ist aber

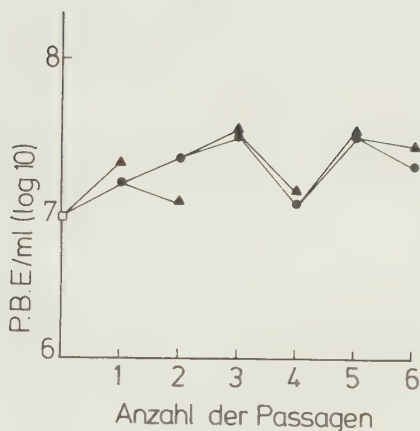


Abb. 1. Einfluß von Na-Pyruvat und Glukose auf die Infektiosität von VSV.

In embryonalen Hühnerzellen gezüchtetes Virus wurde über 12 Std. bei 4° C gegen PBS dialysiert und in embryonierten Hühnerzellkulturen, die pyruvat- bzw. glukosehaltiges Earle's Medium enthielten, passagiert. Die Weiterpassage von in pyruvathaltigem Medium gewachsenem VSV (Py-VSV) erfolgte dann jeweils in Pyruvatmedium oder in glukosehaltigem Medium. Das in Gegenwart von Glukose gewachsene Virus (1. - 6. Passage) wurde vor der Infektiositätsbestimmung 12 Std. bei 4° C gegen PBS dialysiert. Das in Gegenwart von Pyruvat gewachsene Virus wurde während dieser Zeit bei 4° C gelagert.

- in Anwesenheit von Na-Pyruvat
- ▲ in Anwesenheit von Glukose

dann möglich, wenn für die Infektion VSV benutzt wird, das entweder vor der Infektion gegen PBS dialysiert oder in pyruvathaltigem Medium gezüchtet und anschließend im gleichen Medium gehalten wurde (Abb. 2). Die für eine vollständige Hemmung der VSV-Vermehrung notwendige 2-DOG-Dosis entspricht derjenigen, die für die Hemmung des SFV erforderlich ist (vergl. Kaluza, Schmidt u. Scholtissek, 1973).

Wie aus der Abb. 2 weiterhin hervorgeht, lassen sich die beim VSV erhaltenen Erfahrungen auf das NDV übertragen. Auch hier läßt sich die Virusvermehrung durch 2-DOG nur dann hemmen, wenn das zur Infektion benutzte, im embryonierten Hühnerei gezüchtete NDV vorher gegen PBS dialysiert war und die 2-DOG-Hemmung in Zellen durchgeführt wurde, die nach der Virusadsorption mit pyruvathaltigem Medium überschichtet worden waren.

Die Versuchsergebnisse deuten darauf hin, daß eine Hemmung der VSV- und NDV-Vermehrung durch 2-DOG nur dann möglich ist, wenn von der Infektion an den Zellen keine Glukose mehr angeboten wird. Das würde bedeuten, daß geringste Glukosemengen während der frühesten Vermehrungsphase eine 2-DOG-Hemmung ausschließen. Um diese Vermutung zu prüfen, wurde VSV, das in pyruvathaltigem Medium gezüchtet oder aber gegen PBS dialysiert worden war, zur Infektion zu gleichen Teilen mit pyruvat- bzw. glukosehaltigem Medium gemischt und anschließend der Einfluß von 2-DOG im pyruvathaltigen Medium ermittelt.

Wie aus der Tab. 1 hervorgeht, hat die Zugabe von Glukose zum dialysierten bzw. im pyruvathaltigen Medium gezüchteten VSV keinen Einfluß auf den Hemmeffekt durch 2-DOG.

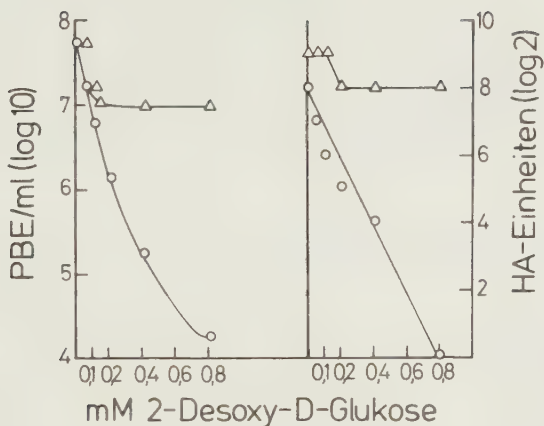


Abb. 2. Einfluß der 2-Desoxy-D-Glukose auf die Vermehrung von NDV (rechts) und VSV (links) in pyruvathaltigem Earle's Medium.

Sowohl in pyruvathaltigem Medium (O) als auch in glukosehaltigem Medium (Δ) gewachsenes Virus wurde zur Infektion verwendet. Sofort nach der Adsorptionszeit (30 Min.) wurden die auf der Abszisse bezeichneten Mengen von 2-DOG in frischem Pyruvatmedium zugesetzt. Das zellassoziierte Virus wurde 8 Std. p.i. bestimmt.

Tabelle 1

Inaktivierung von VSV durch 2-Desoxyglukose unter verschiedenen Bedingungen

Zur Infektion benutztes virushaltiges Medium	Zur Vermehrung benutztes Medium	PBE/ml
PY-VSV + PY-Med.	PY-Med.	2 x 10 ⁸
PY-VSV + PY-Med.	PY-Med. + 2-DOG	3 x 10 ⁴
PY-VSV + GL-Med.	PY-Med.	9,5 x 10 ⁷
PY-VSV + GL-Med.	PY-Med. + 2-DOG	5,5 x 10 ⁵
GL.VSV + PY-Med.	PY-Med.	1,6 x 10 ⁸
GL.VSV + PY-Med.	PY-Med. + 2-DOG	6,5 x 10 ⁷
GL.VSV + GL-Med.	PY-Med.	6,2 x 10 ⁷
GL.VSV + GL-Med.	PY-Med. + 2-DOG	1,3 x 10 ⁷
DI.VSV + PY-Med.	PY-Med.	8,7 x 10 ⁶
DI.VSV + PY-Med.	PY-Med. + 2-DOG	ø
DI.VSV + GL-Med.	PY-Med.	5,2 x 10 ⁶
DI.VSV + GL-Med.	PY-Med. + 2-DOG	5,0 x 10 ³

24 Stunden alte Hühnerzellkulturen in Plastik-Petrischalen mit einem Durchmesser von 5 cm wurden 2mal mit warmer PBS gewaschen und sodann mit 1 ml der entsprechenden Virussuspension infiziert. Nach der 30 Min. langen Adsorptionszeit wurden die Zellen erneut 2mal mit warmer PBS gewaschen und mit 3 ml des jeweiligen Mediums überschichtet. Die Kulturen wurden 8 Std. p.i. auf ihre Infektiosität geprüft.

PY-VSV: in pyruvathaltigem Medium gewachsenes VSV

GL.VSV: in glukosehaltigem Medium gewachsenes VSV

DI.VSV: 12 Std. gegen PBS dialysiertes, in glukosehaltigem Medium gewachsenes VSV

PY-Med: Earle's Medium mit Na-Pyruvat und Hepes-Puffer

GL-Med: Earle's Medium mit 2fach Glukose

2-DOG : Zusatz von 0,5 mM 2-DOG in das Nährmedium

Die Vermutung, daß die 2-DOG-Wirkung bei VSV erst dann eintritt, wenn bereits bei der Infektion der Zellen die Glukosezufuhr unterbrochen ist, trifft daher nicht zu. Bei der Hemmung des VSV durch 2-DOG in pyruvat-haltigem Medium muß deshalb eine andere Substanz eine Rolle spielen, deren Größe so gering ist, daß sie sich durch Dialyse aus dem Medium entfernen läßt.

2. Hemmung der VSV-Vermehrung durch 2-DOG nach Doppelinfektion

Bei Untersuchungen über die Aufnahme und den Einbau von 2-DOG in embryonalen Hühnerzellen wurde gefunden (Scholtissek et al., 1973), daß beide nach Infektion mit solchen Viren wesentlich gesteigert sind, die durch 2-DOG in ihrer Vermehrung gehemmt werden. Daher kann man annehmen, daß 2-DOG nur in solchen Virus-Zell-Systemen voll zur Wirkung kommt, in denen es in genügender Menge aufgenommen wird. Bei Doppelinfektion mit KP-Virus (das Virus der klassischen Geflügelpest ist durch 2-DOG hemmbar) und VSV sollte es daher möglich sein, die Vermehrung von letzterem auch im glukosehaltigen Medium durch 2-DOG zu hemmen. Ein derartiger Versuch ist durchführbar, da VSV durch das KP-Virus in seiner Vermehrung nicht beeinflußt wird (Rott et al., 1972).

Der in Tab. 2 dargestellte Versuch wurde folgendermaßen ausgeführt:

Von 48 Stunden alten, in Plastik-Petrischalen mit einem Durchmesser von 5 cm angezüchteten embryonalen Hühnerzellen, wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellrasen zweimal mit warmer PLS gewaschen. Anschließend wurden die Zellrasen mit KP-Virus, mit VSV oder mit beiden in der in Tab. 2 angegebenen Weise infiziert.

Tabelle 2

Einfluß von 2-Desoxyglukose auf die Vermehrung von VSV nach
Doppelinfection mit dem KP-Virus

Zur Infektion benutztes Virus (Adsorptionszeit)	Behandlung der infizierten Zellen			PBE/ml
30 Min.	2 Std.	30 Min.		
KP				$1,5 \times 10^8$
KP	10 mM 2-DOG			$3,2 \times 10^5$
KP			10 mM 2-DOG	$6,0 \times 10^6$
KP + VSV				$2,0 \times 10^7$
KP + VSV	10 mM 2-DOG			$4,2 \times 10^6$
KP		VSV		$1,3 \times 10^6$
KP		VSV	10 mM 2-DOG	$4,0 \times 10^4$
VSV				$2,6 \times 10^8$
VSV	10 mM 2-DOG			$5,5 \times 10^7$
		VSV		$1,9 \times 10^8$
		VSV	10 mM 2-DOG	$1,2 \times 10^7$

Infektion mit KP-Virus bzw. VSV oder mit beiden. Nach der Adsorption von 30 Min. erhielt ein Teil der Zellkulturen 10 mM 2-DOG. Ein weiterer Teil der Zellkulturen wurde 2 Std. p.i. mit VSV superinfiziert. Einige Zellkulturen erhielten wie in Tab. 2 angegeben 2 1/2 Std. p.i. 10 mM 2-DOG. 2-DOG blieb in jedem Falle während der gesamten Inkubationszeit auf den Zellkulturen. Der Versuch wurde 9 Std. p.i. abgebrochen und die Zellen auf den Gehalt an PBE getestet.

Nach der 30 Min. langen Adsorptionszeit wurden die Zellen erneut zweimal mit warmer PBS gewaschen und anschließend unter 2-DOG-haltigem oder 2-DOG-freiem Earle's Medium plus 2fach Glukose bis zur neunten Stunde bei 37° C gehalten. Danach wurde die Infektiosität im Plaquetest bestimmt. Die Infektiosität des VSV wurde in den doppelt-infizierten Chargen in Anwesenheit von KP-Virus-Rekonvaleszentenserum im Plaquetest bestimmt. Dazu wurde das Antiserum 1 : 1 mit PBS gemischt und für 30 Min. bei 56° C gehalten. Von dieser Mischung wurde dann 0,1 ml mit 0,1 ml Zellextrakt in einem Reagenzröhrchen vereinigt, für 30 Min. bei Raumtemperatur belassen und anschließend nach Potenzen von 10 verdünnt.

Aus Tab. 2 geht hervor, daß es tatsächlich möglich ist, nach Doppelinfektion mit dem KP-Virus die Vermehrung des VSV durch 2-Desoxyglukose auch im glukosehaltigen Medium zu hemmen.

3. Hemmung der VSV-Vermehrung durch 2-Desoxyglukose zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion

Es war nun interessant zu prüfen, ob sich die Vermehrung des VSV durch Zugabe von 2-DOG zu späteren Zeiten nach der Infektion beeinflussen läßt. Hierzu wurden den infizierten und im pyruvathaltigen Medium gehaltenen Zellen 2,4 bzw. 6 Std. p.i. 0,5 mM 2-DOG zugesetzt und die Zellen bis zur 8. Std. p.i. weiterbebrütet.

Wie aus Abb. 3 hervorgeht, wird die Vermehrung des VSV grundsätzlich zu jeder Zeit nach der Infektion durch 2-DOG gehemmt. Es ist besonders interessant, daß nach Zugabe von 2-DOG das zellfreie Virus einen signifikant höheren Infektiositäts-Titer einnimmt als das zellgebun-

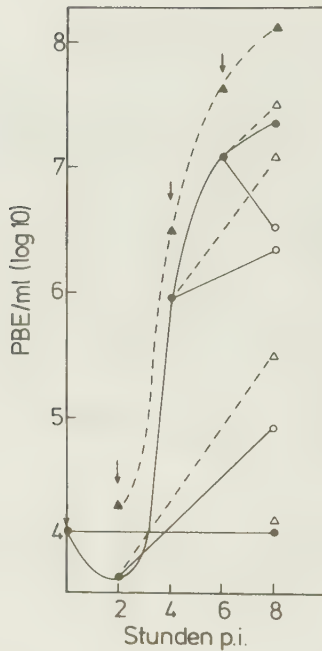


Abb. 3. Hemmung der VSV-Vermehrung durch 2-Desoxy-D-Glukose-Zugabe zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion.

Die Zellen wurden mit in pyruvathaltigem Medium gewachsenem VSV infiziert und mit pyruvathaltigem Medium überschichtet. Zu den durch Pfeile gekennzeichneten Zeiten wurden die Zellen mit 2-DOG-haltigem Medium überschichtet und bis zur 8. Std. p.i. weiterbebrütet. Die Infektiosität, sowohl des zellgebundenen als auch des ins Medium abgegebenen Virus, wurde bestimmt.

- pyruvatgewachsenes VSV, zellgebunden
- ▲ " " , zellfrei
- " " , unter 2-DOG, zellgebunden
- △ " " , " " , zellfrei

dene. Dieser Unterschied ist auch zumindest nach 2-DOG-Zugabe 4 bzw. 6 Std. p.i. wesentlich deutlicher als in nicht behandelten infizierten Kontrollzellen. Nach Zugabe von 2-DOG 6 Std. p.i. nahmen die PBE des zellgebundenen Virus sogar deutlich ab. Diese Befunde konnten in mehreren Experimenten bestätigt werden. Es erscheint daher der Schluß berechtigt, daß nach Zugabe von 2-DOG die begonnene VSV-Synthese zu Ende geführt und das neugebildete Virus aus der Zelle ausgeschleust wird. Eine Neusynthese wird jedoch blockiert.

4. Aufhebung der 2-Desoxyglukose-Wirkung durch Mannose und Glukose

Beim SFV läßt sich die Hemmwirkung von 2-DOG durch Mannose oder Glukose aufheben (Kaluza, Schmidt u. Scholtissek, 1973). Bei entsprechenden Versuchen mit dem VSV wurde zur Infektion embryonaler Hühnerzellen solches Virus benutzt, das in pyruvathaltigem Medium gezüchtet worden war. Nach der Adsorption wurden die Zellen in der üblichen Weise gewaschen und mit pyruvathaltigem Medium überschichtet, dem 0,5 mM 2-DOG und steigende Mengen an Mannose bzw. Glukose zugesetzt waren. Die Ergebnisse eines repräsentativen Versuches sind in Abb. 4 dargestellt. Daraus geht hervor, daß sich die 2-DOG-Hemmwirkung durch beide Zucker aufheben läßt. Dabei ist der Reversionseffekt durch Mannose signifikant stärker als durch Glukose. In Abb. 5 wird gezeigt, daß die Zeit der Zugabe von Glukose nach der 2-DOG-Gabe keinen Einfluß auf die Reversion hat. Bei dem dargestellten Versuch wurden dem pyruvathaltigen Medium nach der Virusadsorption 0,5 mM 2-DOG zugegeben. Zu den in der Abb. 5 angegebenen Zeiten (1, 2, 3 u. 4 Std.) wurden die Zellen

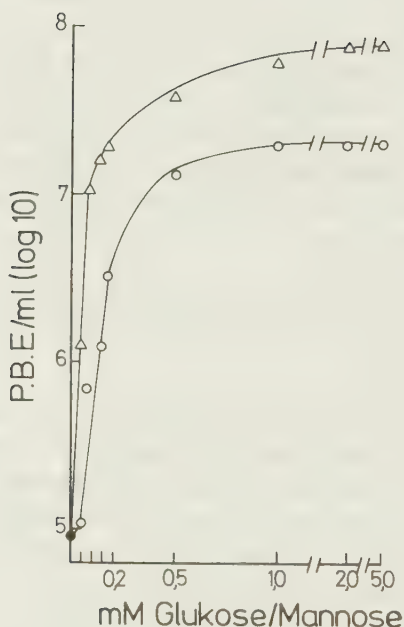


Abb. 4. Aufhebung der 2-Desoxy-D-Glukose-Hemmung durch Glukose oder Mannose.

Die Zellen wurden mit in pyruvathaltigem Medium gewachsenem VSV infiziert. Nach der Adsorptionszeit (30 Min.) wurden die Platten mit pyruvathaltigem Medium plus 0,5 mM 2-DOG überschichtet. Diesem Medium waren die auf der Abszisse angegebenen Mengen Glukose bzw. Mannose zugefügt worden. Die Infektiosität des zellgebundenen Virus wurde 8 Sta. p.i. ermittelt.

○ Zugabe von Glukose, Δ Zugabe von Mannose.

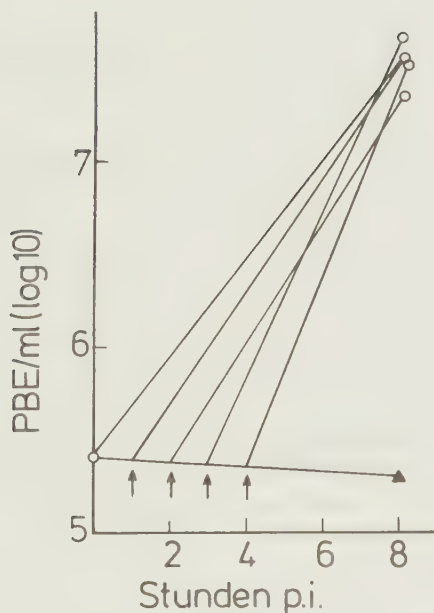


Abb. 5. Aufhebung der 2-Desoxy-D-Glukose-Wirkung durch Glukose zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion.

Die Zellen wurden mit in pyruvathaltigem Medium gewachsenem VSV infiziert. Zu allen Platten wurde 30 Min. p.i. 0,5 mM 2-DOG zugegeben. Zu den angegebenen Zeiten (Pfeile) wurden die jeweiligen Platten 2mal mit warmer PBS gewaschen und bis zur 8. Std. mit glukosehaltigem Medium inkubiert. Die Infektiosität des zellgebundenen Virus wurde nach 8 Std. p.i. bestimmt.

gewaschen und mit pyruvathaltigem Medium, das 10 mM Glukose enthielt, bis zur 8. Std. p.i. weiterinkubiert. Gleichgültig wann der 2-DOG-Effekt aufgehoben wurde, lag die Plaqueausbeute 8 Std. p.i. jeweils in der gleichen Größenordnung. Entsprechende Ergebnisse wurden erhalten, wenn anstelle von Glukose 10 mM Mannose verwendet wurde. Wie aus Tab. 3 hervorgeht, haben Fruktose, Glukosamin und Galaktose dagegen keinen oder nur sehr geringen Einfluß auf die Hemmwirkung von 2-DOG. Zu dem in Tab. 3 beschriebenen Versuch wurde in pyruvathaltigem Medium gewachsenes VSV im Verhältnis 1 : 1 mit dem in der Tabelle angegebenen zuckerhaltigen Medium gemischt. Jede Platte (Durchmesser: 5 cm) wurde mit 1 ml der Suspension infiziert. Nach der 30 Min. langen Adsorptionszeit wurde von den Platten der Überstand abgesaugt und die Einschichtkulturen 2 x mit warmer PBS gewaschen. Anschließend wurden die Platten mit pyruvathaltigem Medium, das 0,5 mM 2-DOG enthielt, oder nicht, bis zur 8. Std. bei 37° C inkubiert. Danach wurde die Infektiosität im Plaque-test ermittelt.

Tabelle 3

		PBE/ml
PY-VSV + Fruktose-Medium	+ 2-DOG	$1,5 \times 10^5$
PY-VSV + Glukosamin-Medium	+ 2-DOG	$1,5 \times 10^5$
PY-VSV + Galaktose-Medium	+ 2-DOG	$1,5 \times 10^5$
PY-VSV + PY-Medium	+ 2-DOG	$4,0 \times 10^4$
PY-VSV + PY-Medium	- 2-DOG	$2,1 \times 10^8$

PY = Pyruvat

Da bei den Reversionsversuchen in etwa immer die gleiche Plaquezahl, unabhängig von der Zeit der Glukose- bzw. Mannosezugabe, erreicht wurde, erhob sich die Frage, inwieweit die Latenzperiode der VSV-Vermehrung durch 2-DOG beeinflußt wird. Aufgrund der bei anderen Viren gemachten Erfahrungen (Klenk, Scholtissek u. Rott, 1973; Kaluza, Schmidt u. Scholtissek, 1973) wäre es möglich, daß unter der Wirkung von 2-DOG auch beim VSV verschiedene Phasen der Virusvermehrung anlaufen. Dies müßte nach Aufhebung der Hemmwirkung zu einer Verkürzung der Latenzzeit führen. Bei Versuchen zur Klärung dieser Frage wurden VSV-infizierte Zellkulturen nach der Virusadsorption mit pyruvathaltigem Medium, das 0,5 mM 2-DOG enthielt, überschichtet. Einem Teil der Zellkulturen wurde 4 Std. nach 2-DOG-Zugabe 10 mM Glukose zugefügt. Zu verschiedenen Zeiten p.i. wurden jeweils 2 Zellkulturen entnommen und das zellgebundene Virus im Plaquetest bestimmt. Als Kontrollen dienten infizierte Zellkulturen, denen keine 2-DOG zugesetzt worden war.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abb. 6 dargestellt. Danach steigt die Infektiosität ohne erkennbare Verzögerung unmittelbar nach der Reversion des 2-DOG-Blockes an. Die entsprechende Vermehrungskurve läuft mit derjenigen der Kontrolle parallel. Nach 8 Std. p.i. wird derselbe Infektiositätstitler erreicht wie im ungehemmten System. Daher ist der Schluß berechtigt, daß unter 2-DOG gewisse Prozesse der VSV-Vermehrung ablaufen, die nach Aufhebung des 2-DOG-Einflusses unmittelbar zur Fertigstellung neugebildeter Viruspartikel führen.

Entsprechende Ergebnisse wurden erreicht, wenn anstelle von Glukose (10 mM) Mannose (10 mM) zur Reversion benutzt wurde.

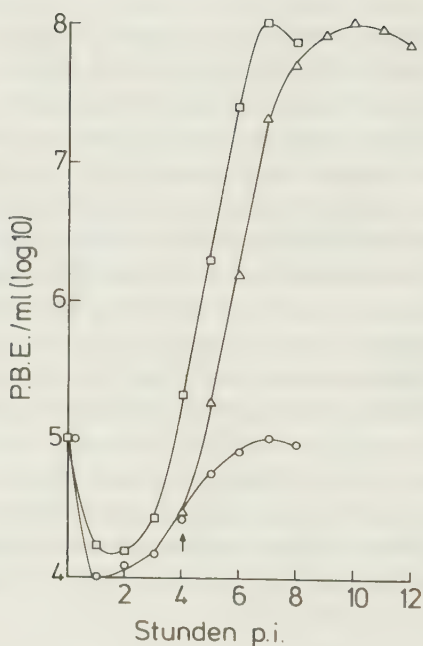


Abb. 6. Aufhebung des 2-Desoxy-D-Glukose-Effektes durch Glukose.

Die Zellen wurden mit in pyruvathaltigem Medium gewachsenem VSV infiziert. Nach der Infektion wurden die Zellen in pyruvat- oder glukosehaltigem Medium inkubiert. Die Kulturen im pyruvathaltigen Medium erhielten 0,5 mM 2-DOG. Zu einigen Kulturen wurde 4 Std. p.i. (Pfeile) 10 mM Glukose zugesetzt. Zu den auf der Abszisse angegebenen Zeiten wurde die Infektiosität bestimmt.

- glukosehaltiges Medium ohne 2-DOG
- pyruvathaltiges Medium plus 0,5 mM 2-DOG
- △ wie ○, aber nach 4 Std. p.i. 10 mM Glukose zugesetzt.

5. Einfluß von 2-Desoxyglukose auf die Proteinsynthese VSV-infizierter embryonaler Hühnerzellen

Zur Prüfung der Frage, inwieweit 2-DOG die Proteinsynthese VSV-infizierter Zellen beeinflusst, wurden infizierte embryonale Hühnerzellen in An- bzw. Abwesenheit von 2-DOG 1, 3 bzw. 5 Stunden p.i. mit 1,25 $\mu\text{Ci}/^3\text{H}$ -Leucin pro Kultur für 30 Min. markiert, danach der Einbau des Isotops durch 2maliges Waschen mit kalter PBS gestoppt und anschließend nach TCE-Extraktion der säurelösliche Anteil (= Protein) ausgewertet. Dieser Anteil wurde mit demjenigen nichtinfizierter Zellen verglichen. Wie aus Abb. 7 hervorgeht, wird der Einbau von ^3H -Leucin in das Protein VSV-infizierter Zellen in den ersten 5 Stunden um etwa 50% gehemmt.

In Anwesenheit von 2-DOG verläuft diese Hemmung wesentlich schneller und ist zu jeder geprüften Zeit deutlich verstärkt.

6. Synthese der VSV-RNS in Gegenwart von 2-Desoxyglukose

Der Einfluß von 2-DOG auf den Einbau von radioaktivem Uridin in die RNS wurde in normalen und in VSV-infizierten embryonalen Hühnerzellen bestimmt. Hierzu wurden die Zellen in der üblichen Weise infiziert und nach der Infektion mit pyruvathaltigem Medium überschichtet, das 0,5 mM 2-DOG und 0,5 γ /ml Actinomycin D enthielt. Actinomycin D wurde zur Hemmung der zellulären RNS zugegeben. Eine bzw. fünf Stunden nach der Infektion wurden 2,5 μCi ^3H -Uridin den Zellkulturen zugesetzt und die Zellen 15, 30, 45, 60, 75 und 90 Min. später, wie in "Material und Methoden" beschrieben, aufgearbeitet.

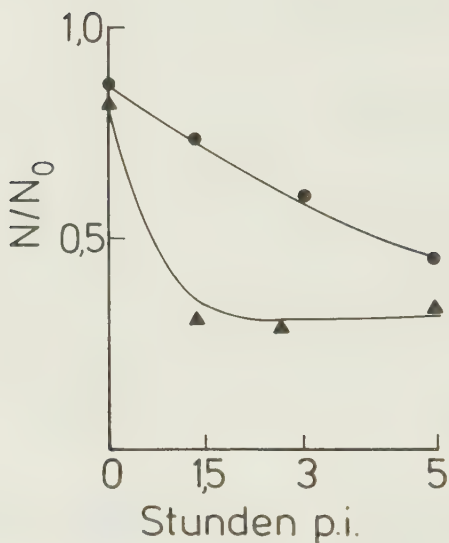


Abb. 7. Wirkung von VSV auf die Proteinsynthese in embryonierten Hühnerzellen.

Zu den infizierten Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten 1,25 μCi ^3H -Leucin pro Kultur in das Nährmedium hinzugegeben. 40 Min. später wurde der Einbau des Isotops durch 2maliges Waschen mit kalter PBS gestoppt. Nach TCE-Extraktion wurde der säureunlösliche Anteil ausgewertet.

● VSV ohne 2-DG, ▲ VSV mit 0,5 mM 2-DG.

Nichtinfizierte Zellkulturen wurden entsprechend behandelt.

Wie aus Abb. 8 hervorgeht, zeigt die VSV-RNS-Synthese im ungehemmten System nach einer geringen Verzögerung einen nahezu linearen Verlauf, wenn der radioaktive Puls 5 Std. nach der Infektion gesetzt worden war. Unter dem Einfluß von 2-DOG wird die Virus-RNS-Synthese von Anfang an gehemmt und erreicht nur etwa 20% der Rate des nicht gehemmten Systems. Wird der radioaktive Puls 1 Std. p.i. gesetzt, stimmen die Werte aus infizierten und nichtinfizierten Zellen überein. Das heißt, daß zu dieser Zeit noch keine nennenswerte Menge an VSV-RNS gebildet wird.

7. Verhalten der VSV-spezifischen RNS-Polymerase in Gegenwart von 2-DOG

Wie Abb. 9 zeigt, beträgt die Aktivität der VSV-spezifischen RNS-Polymerase in Extrakten infizierter Zellen, die in Anwesenheit von 0,5 mM 2-DOG in pyruvathaltigem Medium gehalten wurden, 5 Stunden nach der Infektion nur etwa 20% derjenigen nicht gehemmter Kontrollen. Die in Anwesenheit von 2-DOG 5 Std. p.i. gebildete Polymerase ist in ihrer Aktivität jedoch signifikant höher als diejenige, die nach 1 Std. p.i. nachzuweisen war. Das bedeutet, daß die 5 Std. p.i. nachgewiesene Aktivität nicht auf die im Viruspartikel vorhandene RNS-Polymerase zurückzuführen ist.

Die in nichtinfizierten Zellen vorhandene Polymerase-Aktivität entspricht ungefähr derjenigen, die 1 Stunde nach der Infektion bestimmt worden war.

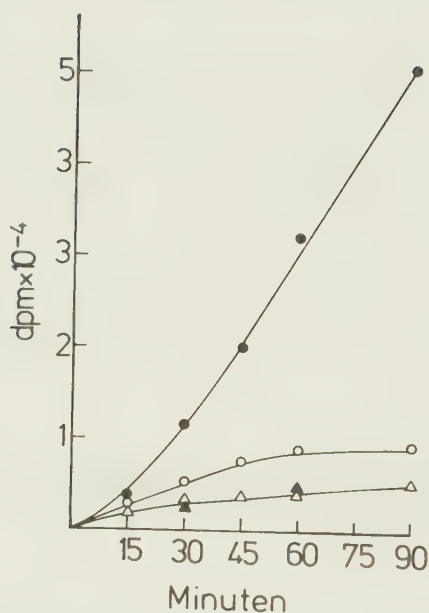


Abb. 8. Virus-RNS-Synthese in VSV-infizierten Zellen unter 2-Desoxy-D-Glukose.

Py-VSV-infizierte Zellen oder nicht infizierte Zellen wurden untersucht. Allen Kulturen war sofort nach der Infektion 0,5 µg/ml Actinomycin D zugesetzt worden. Nach 1 bzw. 5 Std. p.i. wurde mit 2,5 µCi/pro Kultur ^3H -Uridin ein Puls gesetzt. Die Radioaktivität in der RNS wurde zu den auf der Abszisse bezeichneten Zeiten bestimmt.

- VSV-infiziert, ohne 2-DOG, 5 Std. p.i.
- VSV-infiziert, mit 0,5 mM 2-DOG, 5 Std. p.i.
- △ Nichtinfizierte Zellen, mit 0,5 mM 2-DOG, 1 Std. nach Scheininfection
- ▲ VSV-infiziert, mit 0,5 mM 2-DOG, 1 Std. p.i.

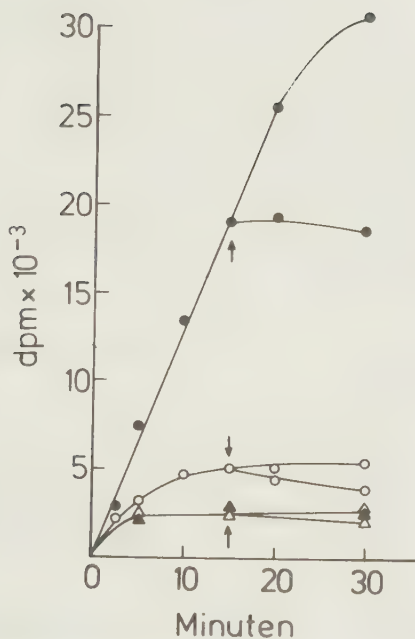


Abb. 9. RNS-Polymerase-Aktivität in VSV-infizierten Zellen mit 2-Desoxy-D-Glukose.

Die Zellen wurden entweder mit Py-VSV, oder nicht infiziert. Unmittelbar nach der Infektion wurde zu allen Kulturen 0,5 µg/ml Actinomycin D zugesetzt. Zu einem Teil der Kulturen wurde 0,5 mM 2-DOG hinzugegeben. Zu den angegebenen Zeiten (Pfeile) wurde das radioaktiv markierte Medium durch Zugabe von 0,15 µg unmarkiertem GTP ersetzt.

- VSV-infiziert, ohne 2-DOG, 5 Std. p.i.
- VSV-infiziert, mit 0,5 mM 2-DOG, 5 Std. p.i.
- △ nichtinfizierte Zellen, mit 0,5 mM 2-DOG, 5 Std. p.i.
- ▲ VSV-infiziert, mit 0,5 mM 2-DOG, 1 Std. p.i.

Aus Abb. 9 geht weiterhin hervor, daß nach Ausverdünnen des radioaktiven Vorläufers durch unmarkiertes GTP ("chase") der radioaktive Einbau in die RNS bei nicht 2-DOG behandelten, infizierten Zellen sofort abgestoppt wird. Die erhaltenen Werte bleiben auf dem gleichen Niveau wie diejenigen vor dem "chase".

Im Gegensatz dazu nehmen die Werte in 2-DOG behandelten Zellen nach dem "chase" kontinuierlich ab. Diese Ergebnisse erlauben den Schluß, daß die unter 2-DOG gebildete RNS-Polymerase instabil ist.

8. Hybridisierung der in vitro und in vivo synthetisierten VSV-RNS

Zur Charakterisierung der in vitro bzw. in vivo in An- und Abwesenheit von 2-DOG synthetisierten VSV-RNS wurden Hybridisierungsexperimente durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 4 dargestellt. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Werte der Gesamt-RNS von Experiment zu Experiment Schwankungen unterlagen. Die Ergebnisse lassen aber die Aussage zu, daß der größte Teil der unter den Versuchsbedingungen synthetisierten RNS virusspezifisch ist, im Einzelstrang vorliegt, und daß in vitro relativ mehr virale RNS und in vivo relativ mehr komplementäre RNS gebildet wird. Signifikante qualitative Unterschiede der im 2-DOG gehemmten und ungehemmten System gebildeten RNS konnten nicht festgestellt werden.

Tabelle 4

Hybridisierung der in vivo oder in vitro synthetisierten VSV

Probe	Dpm in der				
	in vitro-RNS			in vivo-RNS	
	Kontr.	VSV	VSV +DOG	Kontr.	VSV
Gesamt-RNS	232	2.226	748	42	363
Sofort RNase behandelt	38	71	71	13	71
Selbst-hybridisiert	50	297	62	11	125
Hybridisiert mit 5 µg VS-Virion-RNS	43	390	110	14	245
Hybridisiert mit 12 µg VS-Virion-RNS	40	410	108	13	252

Einzelheiten siehe Text.

9. Einfluß von 2-Desoxyglukose auf den Einbau von radio- aktiven Aminosäuren in VSV-Proteine

Wie bereits erwähnt, lassen sich in VSV-infizierten Zellen mit Hilfe der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese 6 Proteine erfassen. Es handelt sich dabei um Polypeptide, die als L = Large, G = Glykoprotein, N = Nucleoprotein und M = niedermolekulares Membranprotein bezeichnet werden und in infektiöse Viruspartikel eingebaut werden. Daneben tritt in infizierten Zellen noch ein NS 1 und NS 2 auf, die Vorläufer des N = Nucleoproteins darstellen sollen (Wagner, 1970). G und M sind Polypeptide der Virusaußenhülle, N ist ein Polypeptid des Nucleokapsids. Wird die VSV-Vermehrung durch Zugabe von 0,5 mM 2-DOG nach der Virusadsorption gehemmt, lassen sich überraschenderweise alle virusspezifischen Polypeptide mit Hilfe der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese erfassen. Sie liegen jedoch in signifikant geringerer Menge vor als in ungehemmten, infizierten Kontrollzellen (Abb. 10).

Bei dem in Abb. 10 dargestellten Versuch wurden die infizierten Zellen 4 Stunden p.i. mit einer ^3H -Aminosäuremischung für eine Stunde markiert und anschließend für die Elektrophorese aufgearbeitet. 2-DOG wurde nach der Virusadsorption zugegeben.

Analoge Ergebnisse wurden erhalten, wenn anstelle von 0,5 mM 0,15 bzw. 0,3 mM 2-DOG den infizierten Zellen nach der Adsorptionszeit angeboten wurde (Abb. 11). Der Einbau der radioaktiven Aminosäuren in die gebildeten Polypeptide war dabei abhängig von der zugegebenen 2-DOG-Konzentration.

Auch nach Zugabe von 0,5 mM 2-DOG zu späteren Zeiten nach der Infektion wurde die Synthese aller virus-

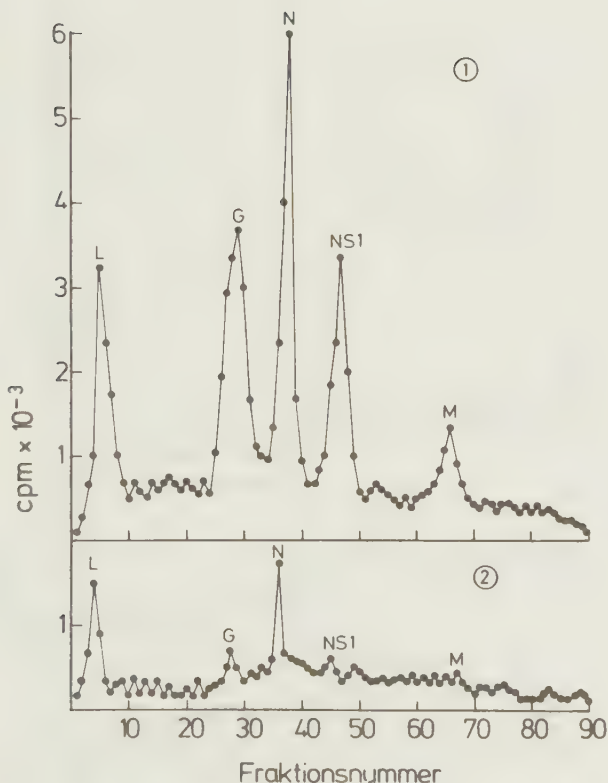


Abb. 10. VSV-Protein-Profile in pyruvathaltigem Medium mit (2) bzw. ohne (1) 2-Desoxy-D-Glukose.

Einschichtkulturen embryonaler Hühnerzellen wurden infiziert und bis zur 4. Std. bei 37° C in pyruvathaltigem Medium bzw. ohne 0,5 mM 2-DOG bebrütet. Danach wurde das Medium abgesaugt und für 1 Std. pyruvathaltiges Medium, dem eine radioaktiv markierte Aminosäuremischung (³H-Tyrosin, ³H-Valin ³H-Leucin, Gesamtaktivität: 10 µCi/ml) mit bzw. ohne 2-DOG zugegeben worden war, inkubiert. Nach der 5. Std. p.i. wurde der Einbau durch 2maliges Waschen mit kalter PBS gestoppt und die Zellen aufgearbeitet.

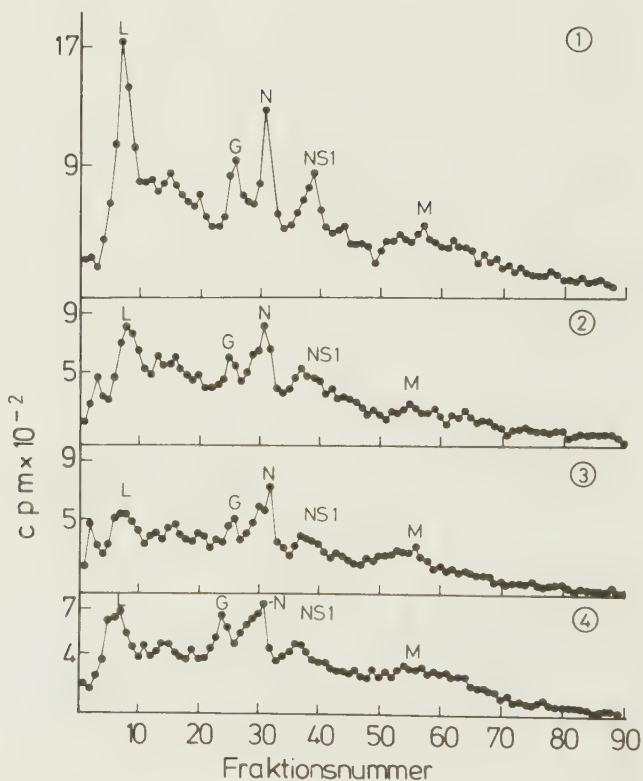


Abb. 11. Einfluß von unterschiedlichen Mengen von 2-Desoxy-D-Glukose auf die VSV-Proteinsynthese.

Methode wie in Abb. 10 angegeben.

- (1) VSV-Profil: ungehemmt
- (2) VSV-Profil: plus 0,15 mM 2-DOG
- (3) VSV-Profil: plus 0,3 mM 2-DOG
- (4) VSV-Profil: plus 0,5 mM 2-DOG

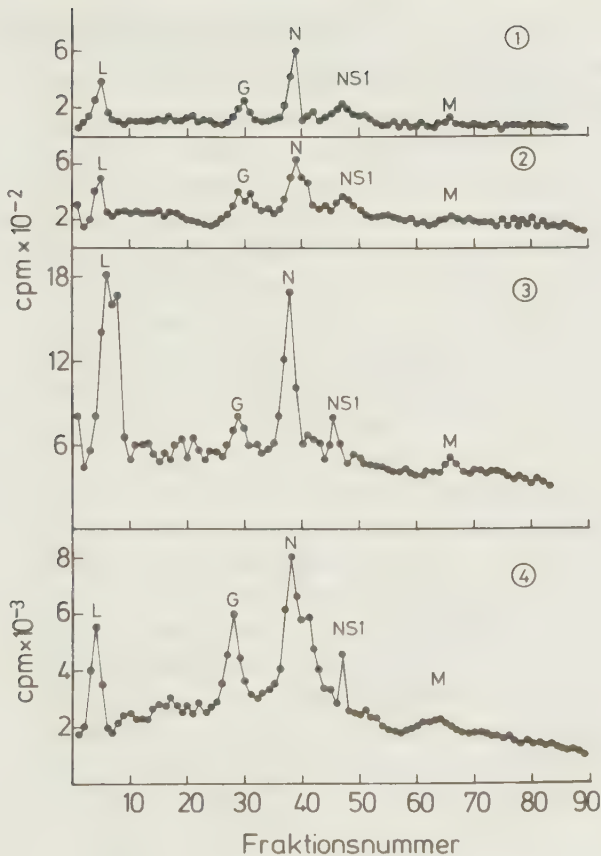


Abb. 12. Einfluß des Zeitpunktes der 2-Desoxy-D-Glukose-Hemmung.

Einschichtkulturen embryonaler Hühnerzellen wurden infiziert und bis zur 4. Std. p.i. (1), 5. Std. p.i. (2), 6. Std. p.i. (3) bei 37°C in pyruvathaltigem Medium bebrütet. Danach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen für 1 Std. mit pyruvathaltigem Medium, dem radioaktiv markierte Aminosäuren ($10\text{ }\mu\text{Ci/ml}$: ^3H -Leucin, ^3H -Tyrosin, ^3H -Valin) und $0,5\text{ mM}$ 2-DOG zugesetzt worden war, weiterinkubiert. Nach der 5. Std. p.i. (1), 6. Std. p.i. (2) bzw. 7. Std. p.i. (3), wurde der Einbau gestoppt und die Zellen aufgearbeitet. In (4) wurde von der 6. bis zur 7. Std. p.i. der Einbau im ungehemmten System geprüft.

spezifischen Polypeptide gehemmt. Eine bevorzugte Hemmung eines bestimmten Polypeptides wurde niemals beobachtet (Abb. 12).

IV. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Wie bereits erwähnt, wird die Vermehrung einer Reihe von Glykoproteid-haltigen Viren - wie Orthomyxo- und Togaviren - durch 2-Desoxyglukose gehemmt, während diejenige von Paramyxo- und Rhabdoviren nicht beeinflusst wird (Kaluza, Scholtissek u. Rott, 1972). Es spricht vieles dafür, daß die Hemmung auf der Ebene der Glykosylierung der virusspezifischen Glykoproteide einsetzt (Klenk, Scholtissek u. Rott, 1972; Kaluza, Schmidt u. Scholtissek, 1973), wobei 2-DOG anstelle von Mannose in die Polysaccharidkette eingebaut zu werden scheint (Scholtissek, Kaluza, Schmidt u. Rott, 1973).

Wie in den hier durchgeführten Untersuchungen gezeigt wurde, wird die Produktion der normalerweise durch 2-DOG nicht hemmbaren NDV und VSV drastisch beeinflusst, wenn die Virusvermehrung in pyruvathaltigen Medien abläuft und wenn zur Infektion solche Viruspartikel verwendet werden, die in diesem Medium gezüchtet wurden. Die für die Hemmung erforderliche 2-DOG-Dosis entspricht derjenigen, die für die Inhibierung von Orthomyxoviren in pyruvathaltigen Medien erforderlich ist (Scholtissek u. Rott, persönl. Mitt.).

Wie aus Tab. 1 hervorgeht, ist eine Hemmung der Vermehrung des eingehender untersuchten VSV jedoch auch in pyruvathaltigem Medium nicht möglich, wenn das zur Infektion benutzte Virus in glukosehaltigem Medium vorliegt. Worauf dieser Effekt beruht, konnte noch nicht geklärt werden. Die während der Adsorptionszeit anwesende Glukose kann die Hemmung jedoch nicht beeinflussen. Es muß sich vielmehr um einen dialysierbaren, also relativ niedermolekularen Faktor handeln,

der in glukosehaltigem Medium von der Zelle ausgeschieden wird. Ist er während der frühen Phase der Virusvermehrung im System vorhanden, ist eine Hemmung nicht möglich.

Von Scholtissek et al. (1973) wurde gezeigt, daß die Aufnahme von 2-DOG in solche Zellen stark erhöht ist, die mit Viren infiziert wurden, deren Vermehrung durch den Zucker inhibiert wird. Es kann daher angenommen werden, daß der unterschiedliche Effekt von 2-DOG auf die Vermehrung der verschiedenen Glykoproteid-haltigen Viren auf der quantitativen Aufnahme und dem Einbau des Antimetaboliten beruht. Dafür würden auch die Befunde sprechen, die bei der Doppelinfektion erhalten wurden. Werden nämlich Zellen simultan mit VSV und dem KP-Virus infiziert, kann das VSV auch in normalen Medien durch 2-DOG in seiner Vermehrung gehemmt werden.

Es ist noch unklar, ob bei der unterschiedlichen Hemmbarkeit der verschiedenen Virusarten auch strukturelle und quantitative Unterschiede in der Kohlenhydratkomponente dieser Viren eine Rolle spielen oder ob nur die Aktivierung des Antimetaboliten nach Infektion mit den verschiedenen Viren unterschiedlich beeinflusst wird.

Betrachtet man die bei der Hemmung des VSV durch 2-DOG erhaltenen Ergebnisse, so wird ein weiterer Unterschied zu den Befunden deutlich, die mit Ortho- und Togaviren erhalten wurden. Wie bereits diskutiert, wird bei diesen offensichtlich die Glykosylierung verhindert oder unvollständig durchgeführt. Beim VSV wird hingegen das Auftreten aller viralen Polypeptide gleichermaßen beeinflusst. Es ist daher auch nicht verwunderlich, wenn die durch die VSV-Infektion bedingte Inhibierung der

Gesamtproteinsynthese durch 2-DOG stärker beeinflusst wird. Die Hemmung aller viralen Polypeptide läßt sich auch beobachten, wenn 2-DOG zu späteren Stunden nach der Infektion zum virusbildenden System zugegeben wird. Unter diesen Bedingungen wird offensichtlich die begonnene Virussynthese abgeschlossen und das neugebildete Virus ausgeschleust. Ein Neubeginn der Virussynthese scheint jedoch zu unterbleiben. Dafür spricht, daß die Infektiosität des zellgebundenen Virus nach Zugabe des Antimetaboliten bis zur 8. Stunde nach der Infektion nicht ansteigt, diejenige des zellfreien Virus jedoch zunimmt (s. Abb. 3) und daß die Synthese der viralen Polypeptide nach 2-DOG-Zugabe immer gleichartig reduziert ist.

Diese Befunde deuten darauf hin, daß beim VSV eine frühe Vermehrungsphase durch 2-DOG betroffen wird. Dieser Schluß wird unterstützt durch die Tatsache, daß nach Behandlung der VSV-infizierten Zellen mit dem Antimetaboliten praktisch keine virusspezifische RNS-Polymerase und nur wenig virale RNS nachgewiesen werden kann. Puls-Chase-Experimente machen darüber hinaus deutlich, daß die unter 2-DOG gebildete Virus-RNS instabil ist.

Auf der anderen Seite läßt sich die durch 2-DOG bedingte Hemmung der Virusvermehrung zu jeder Zeit nach der Infektion durch Glukose und besonders gut durch Mannose aufheben. Nach Aufheben der Hemmung beginnt die Bildung von infektiösem VSV ohne Verzögerung, wie in Abb. 6 gezeigt wird. Das heißt, daß gewisse Frühprozesse der VSV-Vermehrung auch unter 2-DOG ablaufen, so daß die normalerweise beobachtete Latenzperiode so verkürzt wird, daß sie unter den von uns gewählten Bedingungen nicht mehr nachzuweisen ist.

Die von uns erhaltenen Ergebnisse machen deutlich, daß die Hemmung der VSV-Vermehrung in pyruvathaltigem Medium sich grundsätzlich von derjenigen unterscheidet, die bei Orthomyxo- und Togaviren erhalten wurde. Die Frage, in welchen Prozeß der VSV-Vermehrung die Hemmung einsetzt, muß noch offen bleiben. Es ist möglich, daß die VSV-Vermehrung in bestimmten Kompartimenten der Zelle abläuft, die - ähnlich wie beim Poliomyelitisvirus - nach der Infektion gebildet werden. Wenn die Bildung solcher "Virusfabriken", die sicherlich durch Glykolipid- und Glykoproteid-haltige Membranen vom Zytoplasma abgegrenzt sind, durch 2-DOG beeinflusst wird, ist es möglich, daß die neugebildeten Viruskomponenten durch Zellenzyme abgebaut werden, bevor sie sich zu infektiösen Viruspartikeln formieren. Diese Interpretation wird erhärtet durch Befunde von Kaluza (persönl. Mitt.), nach denen auch das nur aus RNS und Protein bestehende Poliomyelitisvirus in seiner Vermehrung durch 2-DOG gehemmt wird, wenn Bedingungen gewählt werden, die den unsrigen weitgehend entsprechen.

Neben der Tatsache, daß sich NDV und VSV unter geeigneten Bedingungen ebenfalls durch 2-DOG in ihrer Vermehrung hemmen lassen, geben unsere Untersuchungen neue Ansatzpunkte zum Studium der frühen Phase der VSV-Vermehrung.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Vermehrung des Virus der vesikulären Stomatitis (VSV) läßt sich durch 2-Desoxy-D-Glukose (2-DOG) hemmen, wenn das zur Infektion benutzte Virus in pyruvat-haltigem Medium gezüchtet und die Hemmung in diesem Medium durchgeführt wurde. Nach Zugabe des Antimetaboliten zu späteren Zeiten nach der Infektion wird die begonnene Virussynthese vollendet; eine Neusynthese wird jedoch immer inhibiert. Die 2-DOG-Wirkung läßt sich zu jeder Zeit durch Mannose und Glukose aufheben.

2-DOG muß in eine frühe Phase der VSV-Vermehrung eingreifen. Die Synthese von Virus-Polymerase, Virus-RNS und Virusproteinen wird durch den Antimetaboliten gehemmt. Die gebildete Virus-RNS ist instabil. Im Gegensatz zu anderen Glykoproteid-haltigen Virusarten, die durch 2-DOG gehemmt werden, wird beim VSV die Synthese aller virusspezifischen Polypeptide durch den Antimetaboliten beeinflusst.

Nach Doppelinfektion mit dem VSV und einem Influenza-virus läßt sich die Vermehrung des VSV auch in solchen Medien inhibieren, in denen nach Einfachinfektion eine Hemmung nicht möglich ist. Der Mechanismus der Hemmung der VSV-Vermehrung durch 2-DOG wird diskutiert.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Baltimore, D., Huang, A. S., Stampfer, M. (1970)

Ribonucleic acid synthesis of vesicular stomatitis virus. II. An RNA-polymerase in the virion.

Proc. Nat. Acad. Sci. 66, 572-576.

Bishop, D. H. L. (1971)

Complete transcription by the transcriptase of VSV

J. Virol. 7, 486-490.

Cartwright, B., Pearce, C. A. (1968)

Evidence for a host cell component in VSV.

J. gen. Virol. 2, 207-214.

Caliguiri, L. A., Klenk, H.-D., Choppin, P. W. (1969)

The proteins of parainfluenza virus SV5.

I. Separation of virion polypeptides by polyacrylamide gel electrophoresis.

Virology 39, 460-466.

Davenport, F. M., Rott, R., Schäfer, W. (1960)

Physical and biological properties of influenza virus components obtained after ether treatment.

J. exp. Med. 112, 765.

David, A. E. (1973)

Assembly of the vesicular stomatitis virus envelope: Incorporation of viral polypeptides into the host plasma membrane.

J. Mol. Biol. 76, 135-148.

Dulbecco, R., Vogt, M. (1954)

Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis virus.

J. exp. Med. 99, 167.

Howatson, A. F., Whitmore, G. F. (1962)

The development and structure of vesicular stomatitis virus.

Virology 16, 466-478.

Kaluza, G., Scholtissek, C., Rott, R. (1972)

Inhibition of the multiplication of enveloped RNA-viruses by glucosamine and 2-deoxy-D-glucose.

J. gen. Virol. 14, 251-259.

Kaluza, G., Schmidt, M. F. G., Scholtissek, C. (1973)

Effect of 2-deoxy-D-glucose on the multiplication of SFV and the reversal of the block by mannose.

Virology 54, 179-189.

Klenk, H.-D., Scholtissek, C., Rott, R. (1972)

Inhibition of glycoprotein biosynthesis of influenza virus by D-glucosamine and 2-deoxy-D-glucose.

Virology 49, 723-734.

Lowry, D. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.
(1951)

Protein measurement with the folin phenol reagent.

J. Biol. Chem. 193, 265.

McSharry, J. J., Wagner, R. R. (1971)

Carbohydrate composition of VSV.

J. Virol. 7, 412.

Rott, R., Scholtissek, C., Klenk, H.-D., Kaluza, G. (1972)

Intrinsic interference between different enveloped RNA viruses.

J. gen. Virol. 17, 235-264.

Scholtissek, C., Kaluza, G., Schmidt, M. F. G., Rott, R. (1973)

Influence of sugar derivatives on glycoprotein synthesis of enveloped viruses.

In: Negative Strand Viruses. (herausgeg. R. D. Barry and B. W. J. Mahy)

Academic Press, London, im Druck.

Simpson, R. W., Hauser, R. E. (1966)

Structural components of vesicular stomatitis virus.

Virology 29, 654-667.

Wagner, R. R., Snyder, R. M., Yamazaki, S. (1970)

Proteins of VSV; kinetics and cellular sites of synthesis.

J. Virol. 5, 548-558.

Wildy, P. (1971)

Classification and nomenclature of viruses.

Monographs in Virology 5, S. Karger AG.

Zimmermann, T., Schäfer, W. (1960)

Effect of p-fluorphenylalanine on the fowl plague virus multiplication.

Virology 11, 676-698.

Herrn Prof. Dr. R. Rott danke ich für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit und für seine allzeit großzügige wissenschaftliche und menschliche Unterstützung.

Mein Dank gilt im besonderen auch Herrn Prof. Dr. C. Scholtissek und Fräulein Michaela Orlich.

Allen Angehörigen des Institutes danke ich für ihre vielseitige Hilfe.

Die Arbeit wurde durch Mittel des Sonderforschungsbereiches 47 (Virologie) finanziert.

Lebenslauf

Name: Gerolf Heinrich Konrad Wilhelm H a u

Geb. am: 12.1.1945

in: Oberissigheim/bei Hanau

Eltern: Rudolf und Anneli Hau, geb. Gerland

Schule: 1952 - 1966

Abschluß: Februar 1966 Reifeprüfung an der
Hohen Landesschule in Hanau

Studium: Veterinärmedizin an der Justus
Liebig-Universität in Gießen

Abschluß des Studiums: 4.7.1972

Approbation: 17.7.1972

Vet.Klinik-Praktikum: Vom 20.7.70 - 30.9.70 Royal Veterinary
College in London

Vet.Praktikantenzeit: Dr. Franz Botz, Königsbach/Baden
vom 18.7.71 - 19.10.71

Familienstand: verheiratet, ein Kind

Seit dem 1.9.72 wissenschaftlicher Angestellter im Sonderfor-
schungsbereich 47 (Virologie).

VERZEICHNIS

1. Einleitung	1
2. Die Aufgabenstellung	2
3. Die Lösungsmethoden	3
4. Die Ergebnisse	4
5. Die Diskussion	5
6. Die Zusammenfassung	6
7. Die Literatur	7
8. Die Anlagen	8
9. Die Tabellen	9
10. Die Zeichnungen	10
11. Die Formeln	11
12. Die Abbildungen	12
13. Die Proben	13
14. Die Messungen	14
15. Die Berechnungen	15
16. Die Ergebnisse	16
17. Die Diskussion	17
18. Die Zusammenfassung	18
19. Die Literatur	19
20. Die Anlagen	20
21. Die Tabellen	21
22. Die Zeichnungen	22
23. Die Formeln	23
24. Die Abbildungen	24
25. Die Proben	25
26. Die Messungen	26
27. Die Berechnungen	27
28. Die Ergebnisse	28
29. Die Diskussion	29
30. Die Zusammenfassung	30
31. Die Literatur	31
32. Die Anlagen	32
33. Die Tabellen	33
34. Die Zeichnungen	34
35. Die Formeln	35
36. Die Abbildungen	36
37. Die Proben	37
38. Die Messungen	38
39. Die Berechnungen	39
40. Die Ergebnisse	40
41. Die Diskussion	41
42. Die Zusammenfassung	42
43. Die Literatur	43
44. Die Anlagen	44
45. Die Tabellen	45
46. Die Zeichnungen	46
47. Die Formeln	47
48. Die Abbildungen	48
49. Die Proben	49
50. Die Messungen	50
51. Die Berechnungen	51
52. Die Ergebnisse	52
53. Die Diskussion	53
54. Die Zusammenfassung	54
55. Die Literatur	55
56. Die Anlagen	56
57. Die Tabellen	57
58. Die Zeichnungen	58
59. Die Formeln	59
60. Die Abbildungen	60
61. Die Proben	61
62. Die Messungen	62
63. Die Berechnungen	63
64. Die Ergebnisse	64
65. Die Diskussion	65
66. Die Zusammenfassung	66
67. Die Literatur	67
68. Die Anlagen	68
69. Die Tabellen	69
70. Die Zeichnungen	70
71. Die Formeln	71
72. Die Abbildungen	72
73. Die Proben	73
74. Die Messungen	74
75. Die Berechnungen	75
76. Die Ergebnisse	76
77. Die Diskussion	77
78. Die Zusammenfassung	78
79. Die Literatur	79
80. Die Anlagen	80
81. Die Tabellen	81
82. Die Zeichnungen	82
83. Die Formeln	83
84. Die Abbildungen	84
85. Die Proben	85
86. Die Messungen	86
87. Die Berechnungen	87
88. Die Ergebnisse	88
89. Die Diskussion	89
90. Die Zusammenfassung	90
91. Die Literatur	91
92. Die Anlagen	92
93. Die Tabellen	93
94. Die Zeichnungen	94
95. Die Formeln	95
96. Die Abbildungen	96
97. Die Proben	97
98. Die Messungen	98
99. Die Berechnungen	99
100. Die Ergebnisse	100
101. Die Diskussion	101
102. Die Zusammenfassung	102
103. Die Literatur	103
104. Die Anlagen	104
105. Die Tabellen	105
106. Die Zeichnungen	106
107. Die Formeln	107
108. Die Abbildungen	108
109. Die Proben	109
110. Die Messungen	110
111. Die Berechnungen	111
112. Die Ergebnisse	112
113. Die Diskussion	113
114. Die Zusammenfassung	114
115. Die Literatur	115
116. Die Anlagen	116
117. Die Tabellen	117
118. Die Zeichnungen	118
119. Die Formeln	119
120. Die Abbildungen	120
121. Die Proben	121
122. Die Messungen	122
123. Die Berechnungen	123
124. Die Ergebnisse	124
125. Die Diskussion	125
126. Die Zusammenfassung	126
127. Die Literatur	127
128. Die Anlagen	128
129. Die Tabellen	129
130. Die Zeichnungen	130
131. Die Formeln	131
132. Die Abbildungen	132
133. Die Proben	133
134. Die Messungen	134
135. Die Berechnungen	135
136. Die Ergebnisse	136
137. Die Diskussion	137
138. Die Zusammenfassung	138
139. Die Literatur	139
140. Die Anlagen	140
141. Die Tabellen	141
142. Die Zeichnungen	142
143. Die Formeln	143
144. Die Abbildungen	144
145. Die Proben	145
146. Die Messungen	146
147. Die Berechnungen	147
148. Die Ergebnisse	148
149. Die Diskussion	149
150. Die Zusammenfassung	150
151. Die Literatur	151
152. Die Anlagen	152
153. Die Tabellen	153
154. Die Zeichnungen	154
155. Die Formeln	155
156. Die Abbildungen	156
157. Die Proben	157
158. Die Messungen	158
159. Die Berechnungen	159
160. Die Ergebnisse	160
161. Die Diskussion	161
162. Die Zusammenfassung	162
163. Die Literatur	163
164. Die Anlagen	164
165. Die Tabellen	165
166. Die Zeichnungen	166
167. Die Formeln	167
168. Die Abbildungen	168
169. Die Proben	169
170. Die Messungen	170
171. Die Berechnungen	171
172. Die Ergebnisse	172
173. Die Diskussion	173
174. Die Zusammenfassung	174
175. Die Literatur	175
176. Die Anlagen	176
177. Die Tabellen	177
178. Die Zeichnungen	178
179. Die Formeln	179
180. Die Abbildungen	180
181. Die Proben	181
182. Die Messungen	182
183. Die Berechnungen	183
184. Die Ergebnisse	184
185. Die Diskussion	185
186. Die Zusammenfassung	186
187. Die Literatur	187
188. Die Anlagen	188
189. Die Tabellen	189
190. Die Zeichnungen	190
191. Die Formeln	191
192. Die Abbildungen	192
193. Die Proben	193
194. Die Messungen	194
195. Die Berechnungen	195
196. Die Ergebnisse	196
197. Die Diskussion	197
198. Die Zusammenfassung	198
199. Die Literatur	199
200. Die Anlagen	200
201. Die Tabellen	201
202. Die Zeichnungen	202
203. Die Formeln	203
204. Die Abbildungen	204
205. Die Proben	205
206. Die Messungen	206
207. Die Berechnungen	207
208. Die Ergebnisse	208
209. Die Diskussion	209
210. Die Zusammenfassung	210
211. Die Literatur	211
212. Die Anlagen	212
213. Die Tabellen	213
214. Die Zeichnungen	214
215. Die Formeln	215
216. Die Abbildungen	216
217. Die Proben	217
218. Die Messungen	218
219. Die Berechnungen	219
220. Die Ergebnisse	220
221. Die Diskussion	221
222. Die Zusammenfassung	222
223. Die Literatur	223
224. Die Anlagen	224
225. Die Tabellen	225
226. Die Zeichnungen	226
227. Die Formeln	227
228. Die Abbildungen	228
229. Die Proben	229
230. Die Messungen	230
231. Die Berechnungen	231
232. Die Ergebnisse	232
233. Die Diskussion	233
234. Die Zusammenfassung	234
235. Die Literatur	235
236. Die Anlagen	236
237. Die Tabellen	237
238. Die Zeichnungen	238
239. Die Formeln	239
240. Die Abbildungen	240
241. Die Proben	241
242. Die Messungen	242
243. Die Berechnungen	243
244. Die Ergebnisse	244
245. Die Diskussion	245
246. Die Zusammenfassung	246
247. Die Literatur	247
248. Die Anlagen	248
249. Die Tabellen	249
250. Die Zeichnungen	250
251. Die Formeln	251
252. Die Abbildungen	252
253. Die Proben	253
254. Die Messungen	254
255. Die Berechnungen	255
256. Die Ergebnisse	256
257. Die Diskussion	257
258. Die Zusammenfassung	258
259. Die Literatur	259
260. Die Anlagen	260
261. Die Tabellen	261
262. Die Zeichnungen	262
263. Die Formeln	263
264. Die Abbildungen	264
265. Die Proben	265
266. Die Messungen	266
267. Die Berechnungen	267
268. Die Ergebnisse	268
269. Die Diskussion	269
270. Die Zusammenfassung	270
271. Die Literatur	271
272. Die Anlagen	272
273. Die Tabellen	273
274. Die Zeichnungen	274
275. Die Formeln	275
276. Die Abbildungen	276
277. Die Proben	277
278. Die Messungen	278
279. Die Berechnungen	279
280. Die Ergebnisse	280
281. Die Diskussion	281
282. Die Zusammenfassung	282
283. Die Literatur	283
284. Die Anlagen	284
285. Die Tabellen	285
286. Die Zeichnungen	286
287. Die Formeln	287
288. Die Abbildungen	288
289. Die Proben	289
290. Die Messungen	290
291. Die Berechnungen	291
292. Die Ergebnisse	292
293. Die Diskussion	293
294. Die Zusammenfassung	294
295. Die Literatur	295
296. Die Anlagen	296
297. Die Tabellen	297
298. Die Zeichnungen	298
299. Die Formeln	299
300. Die Abbildungen	300
301. Die Proben	301
302. Die Messungen	302
303. Die Berechnungen	303
304. Die Ergebnisse	304
305. Die Diskussion	305
306. Die Zusammenfassung	306
307. Die Literatur	307
308. Die Anlagen	308
309. Die Tabellen	309
310. Die Zeichnungen	310
311. Die Formeln	311
312. Die Abbildungen	312
313. Die Proben	313
314. Die Messungen	314
315. Die Berechnungen	315
316. Die Ergebnisse	316
317. Die Diskussion	317
318. Die Zusammenfassung	318
319. Die Literatur	319
320. Die Anlagen	320
321. Die Tabellen	321
322. Die Zeichnungen	322
323. Die Formeln	323
324. Die Abbildungen	324
325. Die Proben	325
326. Die Messungen	326
327. Die Berechnungen	327
328. Die Ergebnisse	328
329. Die Diskussion	329
330. Die Zusammenfassung	330
331. Die Literatur	331
332. Die Anlagen	332
333. Die Tabellen	333
334. Die Zeichnungen	334
335. Die Formeln	335
336. Die Abbildungen	336
337. Die Proben	337
338. Die Messungen	338
339. Die Berechnungen	339
340. Die Ergebnisse	340
341. Die Diskussion	341
342. Die Zusammenfassung	342
343. Die Literatur	343
344. Die Anlagen	344
345. Die Tabellen	345
346. Die Zeichnungen	346
347. Die Formeln	347
348. Die Abbildungen	348
349. Die Proben	349
350. Die Messungen	350
351. Die Berechnungen	351
352. Die Ergebnisse	352
353. Die Diskussion	353
354. Die Zusammenfassung	354
355. Die Literatur	355
356. Die Anlagen	356
357. Die Tabellen	357
358. Die Zeichnungen	358
359. Die Formeln	359
360. Die Abbildungen	360
361. Die Proben	361
362. Die Messungen	362
363. Die Berechnungen	363
364. Die Ergebnisse	364
365. Die Diskussion	365
366. Die Zusammenfassung	366
367. Die Literatur	367
368. Die Anlagen	368
369. Die Tabellen	369
370. Die Zeichnungen	370
371. Die Formeln	371
372. Die Abbildungen	372
373. Die Proben	373
374. Die Messungen	374
375. Die Berechnungen	375
376. Die Ergebnisse	376
377. Die Diskussion	377
378. Die Zusammenfassung	378
379. Die Literatur	379
380. Die Anlagen	380
381. Die Tabellen	381
382. Die Zeichnungen	382
383. Die Formeln	383
384. Die Abbildungen	384
385. Die Proben	385
386. Die Messungen	386
387. Die Berechnungen	387
388. Die Ergebnisse	388
389. Die Diskussion	389
390. Die Zusammenfassung	390
391. Die Literatur	391
392. Die Anlagen	392
393. Die Tabellen	393
394. Die Zeichnungen	394
395. Die Formeln	395
396. Die Abbildungen	396
397. Die Proben	397
398. Die Messungen	398
399. Die Berechnungen	399
400. Die Ergebnisse	400
401. Die Diskussion	401
402. Die Zusammenfassung	402
403. Die Literatur	403
404. Die Anlagen	404
405. Die Tabellen	405
406. Die Zeichnungen	406
407. Die Formeln	407
408. Die Abbildungen	408
409. Die Proben	409
410. Die Messungen	410
411. Die Berechnungen	411
412. Die Ergebnisse	412
413. Die Diskussion	413
414. Die Zusammenfassung	414
415. Die Literatur	415
416. Die Anlagen	416
417. Die Tabellen	417
418. Die Zeichnungen	418
419. Die Formeln	419
420. Die Abbildungen	420
421. Die Proben	421
422. Die Messungen	422
423. Die Berechnungen	423
424. Die Ergebnisse	424
425. Die Diskussion	425
426. Die Zusammenfassung	426
427. Die Literatur	427
428. Die Anlagen	428
429. Die Tabellen	429
430. Die Zeichnungen	430
431. Die Formeln	431
432. Die Abbildungen	432
433. Die Proben	433
434. Die Messungen	434
435. Die Berechnungen	435
436. Die Ergebnisse	436
437. Die Diskussion	437
438. Die Zusammenfassung	438
439. Die Literatur	439
440. Die Anlagen	440
441. Die Tabellen	441
442. Die Zeichnungen	442
443. Die Formeln	443
444. Die Abbildungen	444
445. Die Proben	445
446. Die Messungen	446
447. Die Berechnungen	447
448. Die Ergebnisse	448
449. Die Diskussion	449
450. Die Zusammenfassung	450
451. Die Literatur	451
452. Die Anlagen	452
453. Die Tabellen	453
454. Die Zeichnungen	454
455. Die Formeln	455
456. Die Abbildungen	456
457. Die Proben	457
458. Die Messungen	458
459. Die Berechnungen	459
460. Die Ergebnisse	460
461. Die Diskussion	461
462. Die Zusammenfassung	462
463. Die Literatur	463
464. Die Anlagen	464
465. Die Tabellen	465
466. Die Zeichnungen	466
467. Die Formeln	467
468. Die Abbildungen	468
469. Die Proben	469
470. Die Messungen	470
471. Die Berechnungen	471
472. Die Ergebnisse	472
473. Die Diskussion	473
474. Die Zusammenfassung	474
475. Die Literatur	475
476. Die Anlagen	476
477. Die Tabellen	477
478. Die Zeichnungen	478
479. Die Formeln	479
480. Die Abbildungen	480
481. Die Proben	481
482. Die Messungen	482
483. Die Berechnungen	483
484. Die Ergebnisse	484
485. Die Diskussion	485
486. Die Zusammenfassung	486
487. Die Literatur	487
488. Die Anlagen	488
489. Die Tabellen	489
490. Die Zeichnungen	490
491. Die Formeln	491
492. Die Abbildungen	492
493. Die Proben	493
494. Die Messungen	494
495. Die Berechnungen	495
496. Die Ergebnisse	496
497. Die Diskussion	497
498. Die Zusammenfassung	498
499. Die Literatur	499
500. Die Anlagen	500
501. Die Tabellen	501
502. Die Zeichnungen	502
503. Die Formeln	503
504. Die Abbildungen	504
505. Die Proben	505
506. Die Messungen	506
507. Die Berechnungen	507
508. Die Ergebnisse	508
509. Die Diskussion	509
510. Die Zusammenfassung	510
511. Die Literatur	511
512. Die Anlagen	512
513. Die Tabellen	513
514. Die Zeichnungen	514
515. Die Formeln	515
516. Die Abbildungen	516
517. Die Proben	517
518. Die Messungen	518
519. Die Berechnungen	519
520. Die Ergebnisse	520
521. Die Diskussion	521
522. Die Zusammenfassung	522
523. Die Literatur	523
524. Die Anlagen	524
525. Die Tabellen	525
526. Die Zeichnungen	526
527. Die Formeln	527
528. Die Abbild	

